

## Resum

En aquest projecte s'han sintetitzat nanocristalls de hidroxiapatita a partir de tres tècniques diferents: precipitació química a baixes temperatures, cristallització amb tractament hidrotèrmic en reactor autoclau i reacció en microemulsió. Durant aquests processos de síntesi s'han obtingut diferents morfologies: nanoesferes, nanotubs, nanolàmines i nanoestelles.

S'han seleccionat les condicions de reacció que proporcionen morfologies i agregacions més controlades per encapsular ADN d'esperma de salmó a l'interior dels nanocristalls. L'encapsulació s'ha estudiat i confirmat amb les tècniques d'absorció al UV-visible, FTIR, XPS i electroforesi. S'ha comprovat que la presència d'ADN no altera les morfologies obtingudes. S'ha emprat també un tractament amb enzims per eliminar l'ADN superficial i evitar d'aquesta manera confusions amb l'encapsulat.

Confirmada la possibilitat d'encapsular ADN, la tercera part del projecte ha consistit en estudiar si és possible mantenir la funcionalitat de l'ADN encapsulat. En aquest estudi s'ha emprat el plasmidi pUC19 que té un gen indicador de resistència a l'ampicil·lina per a preparar unes partícules HAp-pUC19 que s'han transfectat en bactèries competents *E. coli* soca DH 5α. Les partícules HAp-pUC19 s'han estudiat amb la tècnica d'UV i la transfecció s'ha confirmat realitzant una electroforesi amb el plasmidi extret i purificat de bactèries competents transfectades i posteriorment cultivades en un medi de cultiu proveït d'ampicil·lina.



# Sumari

<b>Resum .....</b>	<b>1</b>
<b>Sumari .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Glossari .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Prefaci .....</b>	<b>7</b>
2.1 Origen del projecte .....	7
2.2 Motivació .....	7
2.3 Requeriments previs .....	7
<b>3. Introducció .....</b>	<b>8</b>
3.1 Objectius .....	8
3.1.1 Objectius generals.....	8
3.1.2 Objectius específics .....	8
3.2 Abast del projecte.....	8
<b>4. La hidroxiapatita .....</b>	<b>9</b>
4.1 Sals d'ortofosfat de calci (CaP) .....	9
4.2 Estructura cristal·lina i impureses .....	10
4.3 La relació hidroxiapatita-ADN.....	13
4.4 Aplicacions.....	15
4.4.1 Enginyeria de texits.....	15
4.4.2 Nanomedicina .....	16
4.5 Mètodes actuals de preparació de nanopartícules de HAp .....	19
4.6 Variables que afecten la morfologia dels nanocristalls.....	23
<b>5. Materials .....</b>	<b>26</b>
5.1 Reactius .....	26
5.2 Equips.....	28
<b>6. Mètodes de preparació dels cristalls .....</b>	<b>29</b>
6.1 Preparació de nanocristalls de hidroxiapatita .....	29
6.1.1 Procediment per a la preparació de nanocristalls a baixes temperatures.....	29
6.1.2 Procediment per a reacció en reactor autoclau a altes temperatures.....	30
6.1.3 Procediment per a preparació de nanocristalls en micro-emulsió.....	31

6.2	Mètodes emprats per a la encapsulació d'ADN d'esperma de salmó. ....	32
6.2.1	Precipitació química a baixes temperatures en presència d'ADN. ....	32
6.2.2	Reacció a altes temperatures en reactor autoclau en presència d'ADN. ....	33
6.2.3	Eliminació de l'ADN superficial.....	33
6.3	Encapsulació de plasmidi funcional pUC19 i transfecció.....	34
6.3.1	Cultiu i purificació del plasmidi pUC19.....	34
6.3.2	Preparació de les partícules HAp-pUC 19 (encapsulació de pUC19).....	35
6.3.3	Transfecció a bacteries competents i validació amb electroforesi.....	36
<b>7.</b>	<b>Tècniques de caracterització dels cristalls.....</b>	<b>37</b>
7.1	Microscòpia electrònica SEM/TEM.....	37
7.2	Raigs X (XDR).....	38
7.3	Espectroscòpia FTIR.....	39
7.4	Absorció al UV-visible .....	41
7.5	Espectroscòpia de fotoelectrons emesos per raigs X (XPS).....	42
7.6	Electroforesis.....	43
<b>8.</b>	<b>Creixement de cristalls d'HAp .....</b>	<b>45</b>
8.1	Cristalls obtinguts amb el mètode de precipitació química a baixes temperatures. ....	45
8.2	Cristalls obtinguts amb tractament hidrotèrmic en reactor autoclau .....	52
8.3	Cristalls obtinguts en microemulsió .....	55
8.4	Estructura cristal·lina (XDR) .....	56
8.5	Selecció de morfologies i mètodes per a l'encapsulació.....	57
<b>9.</b>	<b>Nucleació i cristal·lització en presència d'ADN d'esperma de salmó.....</b>	<b>58</b>
9.1	Estudi de l'efecte de l'ADN sobre la morfologia.....	58
9.2	Validació de l'encapsulació.....	60
9.2.1	Estudi de l'encapsulació amb absorció al UV-visible.....	60
9.2.2	Estudi de l'encapsulació amb FTIR .....	63
9.2.3	Estudi de l'encapsulació amb XPS .....	64
9.2.4	Estudi de l'encapsulació amb electroforesi .....	67
9.3	Selecció del mètode per a l'encapsulació de plasmidi funcional. ....	68
<b>10.</b>	<b>Estudi de l'encapsulació de plasmidi funcional .....</b>	<b>69</b>
10.1	Verificació de l'encapsulació mitjançant l'absorció en el UV-visible.....	69

10.2 Estudi de la funcionalitat del plasmidi encapsulat amb electroforesi .....	70
<b>11. Avaluació de l'impacte ambiental i de salut (EIAS) i social. ....</b>	<b>71</b>
<b>12. Avaluació econòmica .....</b>	<b>77</b>
<b>Conclusions .....</b>	<b>81</b>
<b>Agraïments.....</b>	<b>83</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>84</b>
Referències bibliogràfiques.....	84
Bibliografia complementaria.....	89

# 1. Glossari

- PFC: Projecte de final de carrera
- HAp: Hidroxiapatita
- HAp-ADN: Cristalls d'hidroxiapatita preparats en presència d'ADN
- pUC19: Plasmidi amb anell de resistència a l'ampicil·lina.
- HAp-pUC19: Cristalls d'hidroxiapatita preparats en presència de pUC19.
- OCP: Fosfat d'octacalci
- CaP: Ortofosfats de calci
- TCP: Fosfat tricàlcic
- TEM: Microscòpia electrònica de transmissió
- SEM: Microscòpia electrònica d'escombratge
- UV: Absorció al UV-visible
- XPS: Espectroscòpia de fotoelectrons emesos per rajos X
- XDR: Difracció de rajos X
- FTIR: Espectroscòpia de infraroig amb transformada de Fourier
- ATR: Reflexió total atenuada
- IR: Espectroscòpia de infraroig
- E. Coli: Bactèries *Escherichia Coli*
- U.A. : Unitats arbitràries
- CTAB: Bromur de hexadeciltrimetilamoni
- SDS: Dodecil sulfat de sodi
- AOT: Docusat sòdic
- EDTA: Àcid etilendiaminotetracètic
- ADN: Àcid desoxirribonucleic
- eV: Electronvolts, unitat d'energia emprada a escala nanoscòpica i adaptada al sistema internacional.
- % v/v: Concentració expressada com a percentatge en volum

## 2. Prefaci

### 2.1 Origen del projecte

L'origen d'aquest projecte és l'aplicació de la hidroxiapatita (HAp) en l'àrea biomèdica, concretament en el desenvolupament d'un vector no viral per a transmetre informació genètica. La hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) és un mineral complex pertanyent a la família de les apatites que constitueix el component principal dels ossos i les dents dels mamífers. Com a conseqüència d'aquest fet, presenta una elevada biocompatibilitat que juntament amb la seva pronunciada tendència a interaccionar amb una gran quantitat de biomolècules orgàniques com ara el col·lagen, proteïnes i l'ADN han fet que sigui considerat un ferm candidat per a usos biomèdics que requereixin materials versàtils i de baixa toxicitat.

Aquest PFC s'emmarca en un projecte més gran del qual en formen part, a més del departament d'Enginyeria Química de l'ETSEIB, l'empresa B. Braun, l'Institut Català de la Salut (ICS) i l'Institut de ciències fotòniques (ICFO).

### 2.2 Motivació

En l'aspecte personal una de les principals motivacions que m'han dut a realitzar aquest projecte ha sigut l'oportunitat de treballar en un equip d'investigació, una experiència que considero enriquidora a nivell professional i personal. També representa una gran motivació la possibilitat d'adquirir nous coneixements acadèmics i professionals tot participant en un projecte d'investigació en un camp encara poc explorat i amb una enorme potencialitat.

### 2.3 Requeriments previs

Per a poder realitzar aquest projecte s'han hagut d'adquirir coneixements suficients sobre les diferents tècniques i instrumental propi d'un laboratori d'investigació, així com coneixements sobre les diferents tècniques analítiques i de caracterització emprades. També s'ha hagut de realitzar una extensa recerca bibliogràfica a l'iniciar el PFC per tal de establir les metodologies més adequades (i adaptar-les a la realitat del laboratori) per a assolir els objectius marcats.

## 3. Introducció

### 3.1 Objectius

#### 3.1.1 Objectius generals

L'objectiu general d'aquest projecte ha sigut estudiar la possibilitat de sintetitzar nanocristalls d'hidroxiapatita en presència de cadenes d'ADN que actuïn com a nucleants, quedant aquestes encapsulades i protegides d'un hipotètic medi agressiu tot mantenint la seva funcionalitat. Les nanopartícules d'hidroxiapatita amb ADN encapsulat podrien constituir un important vector per a la transmissió d'informació genètica.

#### 3.1.2 Objectius específics

Per tal d'assolir l'objectiu general del projecte, van ser establert els següents objectius específics:

- Establir les condicions òptimes per a sintetitzar nanocristalls de morfologies i agregació controlades.
- Encapsular ADN d'esperma de salmó en nanocristalls de morfologia controlada.
- Encapsular ADN plasmídic en nanocristalls de morfologia controlada. Amb aquest objectiu es s'ha treballat amb un anell PUC19 de resistència a l'ampicil·lina. Les partícules HAp-PUC19 han sigut transfectades a bacteris competents.

### 3.2 Abast del projecte

Entra dins de l'abast d'aquest projecte determinar condicions de síntesi que permetin obtenir nanopartícules de morfologies controlades. No s'estudiarà exhaustivament l'efecte de totes i cadascuna de les variables que afecten el creixement dels cristalls (que involucraria un estudi molt més profund). Tampoc s'inclouen estudis cinètics del procés de nucleació i cristal·lització.

També entra dins de l'abast del projecte encapsular cadenes d'ADN d'esperma de salmó a l'interior dels cristalls. També s'inclou avaluar l'encapsulació d'ADN plasmídic si aquestes aquest pot mantenir la seva funcionalitat emprant la transformació de bacteris E.Coli.



## 4. La hidroxiapatita

### 4.1 Sals d'ortofosfat de calci (CaP)

L'HAp pertany al grup de les sals d'ortofosfats de calci. Aquestes sals es classifiquen en funció del ratio molar Ca/P que varia des de 0.5 a 2. L'HAp es caracteritza per contenir calci i fòsfor en la proporció de 1.67 i per ser la sal d'aquest grup que presenta una estabilitat termodinàmica en aigua més gran a pH superior a 5 <sup>[1]</sup>. Totes les sals del grup d'ortofosfats de calci així com alguns dels seus productes de solubilitat (Ks) a 25°C en medi aquós estan recollits en la Taula 4-1.

Taula 4-1. Sals d'ortofosfat de calci <sup>[1]</sup>

Espècie	Ratio Ca/P [molar]	abreviatura	pKs
$\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$	0.5	MCPA	-
$\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5	MCPM	-
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.00	DCPD	6.55
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.00	DCPA	6.90
$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	OCP	48.4 (23.5 °C)
Fosfat de calci amorf	1.50	ACP	10.6
$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50	$\beta$ -TCP	28.92
$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50	$\alpha$ -TCP	25.5
$\alpha^1\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (súper- $\alpha$ )	1.50	$\alpha^1$ TCP	-
Apatita deficient en calci	1.50-1.67	-	-
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	1.67	HAp	58.5
$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.00	TeTCP	38

Totes aquestes sals excepte el  $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$  i el  $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  són molt poc solubles en aigua, essent la hidroxiapatita la fase més insoluble. En l'organisme en condicions normals, el fluid corporal està sobresaturat respecte l'HAp fet que explica l'important paper que juga l'HAp en processos d'ossificació i la formació de càlculs.

Els agregats amorfs d'ACP presenten una energia superficial més baixa que la fase cristal·lina i per tant seria la primera en precipitar en una dissolució sobresaturada a pH neutre o bàsic. A continuació tendeix a evolucionar a una fase més estable, l'OCP, que al seu torn és el precursor de la hidroxiapatita cristal·lina. En funció del ratio d'ions  $\text{Ca}^{2+}/\text{HxPO}_4^{x-3}$  també poden aparèixer altres fases secundàries com per exemple el fosfat de calci amorf.

El TCP és una fase també molt estable que té al seu torn tres formes polimòrfiques diferenciades:  $\alpha$ ,  $\beta$  i súper  $\alpha$ , amb transicions  $\beta \rightarrow \alpha$  a  $1125^\circ\text{C}$  i  $\alpha \rightarrow \text{súper } \alpha$  a  $1430^\circ\text{C}$  [2]. La fase  $\alpha$  presenta una estructura cristal·lina molt similar a la de la hidroxiapatita i pot ser fàcilment transformada per hidròlisis en HAp deficient en calci i OCP (en funció del pH i la temperatura). Per contra, la fase  $\beta$  és molt menys propensa a la hidròlisis que la fase  $\alpha$  i per tant el seu pas a HAp o OCP no està tan afavorit termodinàmicament.

## 4.2 Estructura cristal·lina i impureses

L'estructura de la HAp cristal·lina, completament estequiomètrica i sense impureses ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) correspon a una cel·la monoclínic que correspon el grup espacial  $P2_1/b$  [3]. No obstant, l'habitual presència d'impureses té efectes importants sobre la xarxa cristal·lina i fa que l'estructura més observada pertanyi al sistema hexagonal i concretament al grup espacial  $P6_3/m$  sent els paràmetres de cel·la  $a=b=0,937\text{ nm}$ ,  $c=0,6881\text{ nm}$  [4]. Els ions calcis es poden distribuir o bé formant columnes d'àtoms paral·leles a l'eix  $c$  (s'anomena aquest tipus de calcis com Ca I o columnar) o bé envoltant el canal d'hidroxils en grups de 3 a diferents altures (anomenats Ca II). Cada grup de Calci II presenta una rotació de  $60^\circ$  respecte a l'anterior, motiu pel qual aquests calcis també son anomenats helicoidals. El fòsfor i els corresponents tres àtoms d'oxigen del grup fosfat formen unitats tetragonals i els grups hidroxils es distribueixen de forma desordenada al llarg de l'eix  $c$ , ocupant solament el 50% de les posicions disponibles (Figura 4-1). També hi ha un pla de simetria especular a  $z = \frac{1}{4}$ .

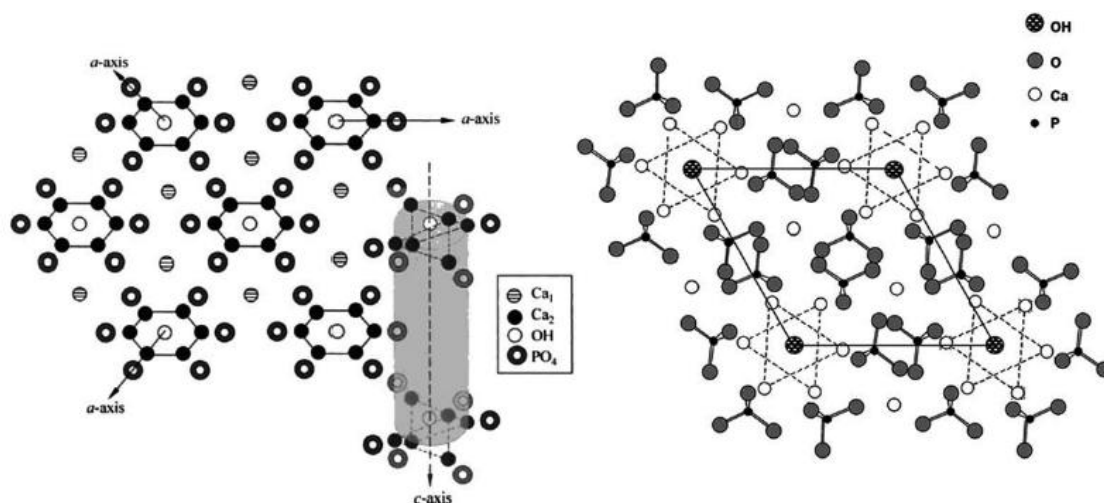
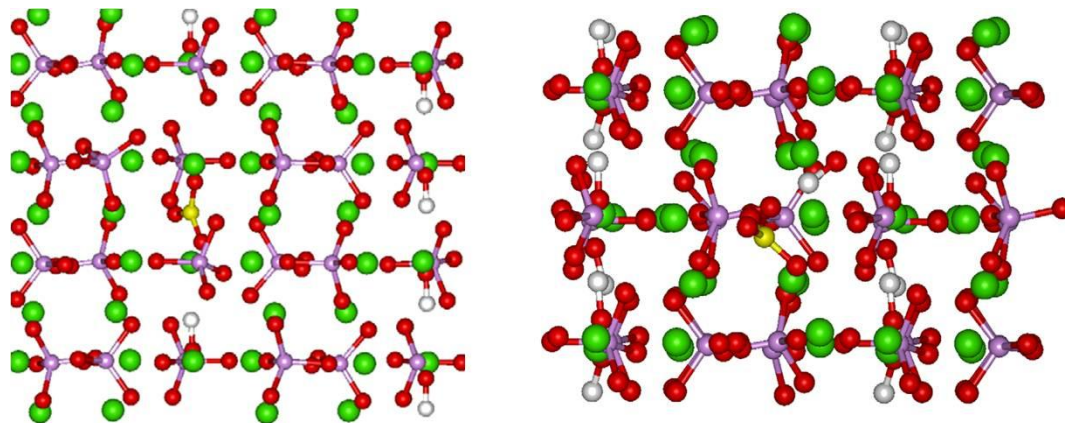


Figura 4-1. Calcis tipus I i II en la xarxa cristal·lina <sup>[3]</sup>

Tot i que se sol representar com a  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , la hidroxiapatita rarament presentarà aquesta composició a causa de l'elevada versatilitat de la seva xarxa cristal·lina que li permet incorporar una gran quantitat d'impureses tan catióniques com anióniques. Les impureses catióniques es distribueixen en la xarxa cristal·lina en funció de la seva mida. Així doncs, els cations més grans (i preferentment divalents) solen ocupar les posicions dels calcis II (helicoïdals), mentre que els cations més petits es distribueixen al llarg dels eixos paral·lels a l'eix cristal·logràfic  $c$  substituint els calcis I (columnars).

Pel que fa a les impureses anióniques, aquestes poden substituir o bé els grups  $\text{OH}^-$  (per exemple  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ) o bé els grups  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\text{VO}_4^{3-}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$  entre d'altres). Cal destacar en especial els ions  $\text{CO}_3^{2-}$  que poden desplaçar tan hidroxils (substitució tipus A) com fosfats (substitució tipus B) i que per tant tenen una gran tendència a incorporar-se a la xarxa cristal·lina (Figura 4-2). De fet, aquesta tendència és tan gran que fins i tot la HAp preparada *in vitro* pot presentar entre un 3% i 8% en massa d'ions carbonat com a conseqüència de la absorció i hidròlisi del  $\text{CO}_2$  atmosfèric <sup>[3]</sup>. És important mencionar que els ions carbonats presenten una càrrega diferent a la dels grups que substitueixen, i per tant això implica que l'estequiometria del cristall es modifica per a mantenir el balanç, fet que al seu torn s'afavoreix l'entrada de més impureses. Un altre efecte de la presència de carbonats és la deformació de la cel·la cristal·logràfica. Els carbonats tipus A expandeixen l'eix  $a$  i contreuen el  $c$ , mentre que els tipus B produeixen l'efecte contrari <sup>[5]</sup>.



**Figura 4-2 Impureses carbonat tipus A (esquerra) i B (dreta) . O = vermell, Ca = verd, P = rosa, H = blanc, C= groc.<sup>[7]</sup>**

En general la presència d'impureses debiliten el cristall i n'augmenten la seva solubilitat <sup>[8]</sup>, amb l'excepció del  $F^-$  que produeix l'efecte contrari <sup>[9],[10]</sup>. A més les impureses també tenen un altre efecte important i és el de provocar un gran nombre de defectes i d'irregularitats en la superfície cristal·lina. Aquestes irregularitats fan que l'HAp natural presenti una rugositat excepcional, fet que té enormes implicacions en la seva biocompatibilitat i capacitat d'interacció amb macromolècules biològiques com ara proteïnes i l'ADN (processos d'adsorció i biomineralització) <sup>[10]</sup>.

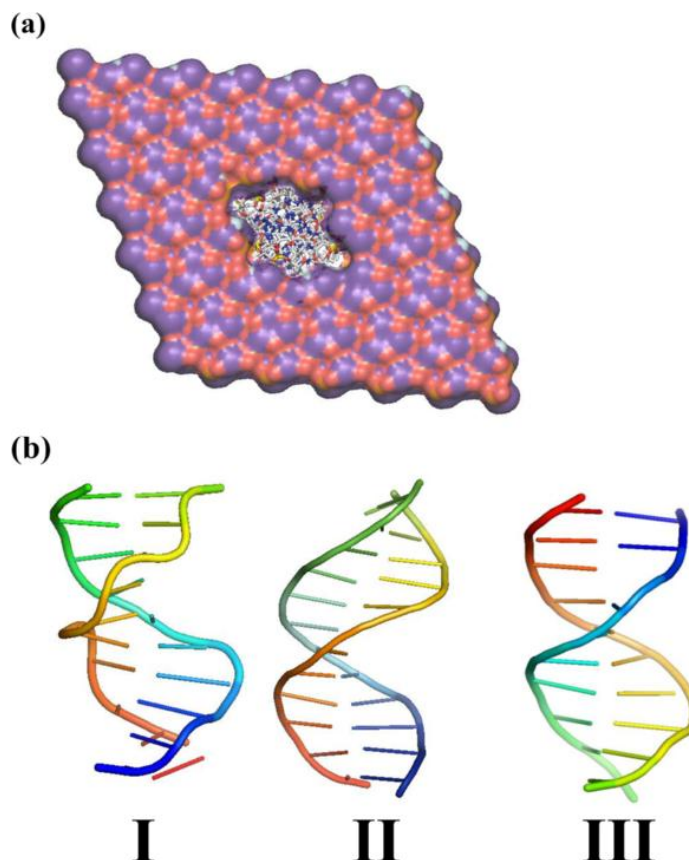
La hidroxiapatita sintetitzada *in vitro* sol ser molt cristal·lina i presentar un nombre d'impureses relativament petit. Per contra, la hidroxiapatita present en els ossos és molt menys cristal·lina i conté un gran nombre de impureses, entre les quals destaquen: magnesi (0,5-0,7% en massa), aigua (9,7%), carbonats (5-8%), zinc (164-217 ppm), estronci (138-155 ppm), alumini (60-73 ppm), plom (29-34 ppm) i bari (18-19 ppm) <sup>[11]</sup>.

### 4.3 La relació hidroxiapatita-ADN

L'elevada afinitat que presenten els cristalls d'hidroxiapatita i l'ADN es deu a les interaccions que s'estableixen entre els grups fosfats de l'esquelet de l'ADN i els ions calci de la superfície cristal·lina. Aquestes interaccions s'han aprofitat ja des de fa anys per a aplicacions de purificació d'ADN en columnes cromatogràfiques d'HAp<sup>[12]</sup>, i recentment un gran nombre de grups d'investigació han començat a investigar de forma més profunda les relacions HAp-ADN en el marc de la ciència biomèdica. L'objectiu d'aquests treballs és sobretot desenvolupar un vector no viral capaç de transportar quantitats suficients d'ADN i que a la vegada presenti una elevada biocompatibilitat i baixa toxicitat. Aquest vector podria ser utilitzat per al tractament de malalties cròniques que de moment es segueixen considerant incurables<sup>[15]</sup>.

Un punt de vista interessant sobre aquesta relació és el proposat per Kostetsky<sup>[13]</sup>, que observà que el període de translació al llarg de l'eix *c* de la xarxa cristal·lina (34 nm) és relativament semblant al període de la molècula de doble hèlix d'ADN. Basant-se en aquest fet i també en la capacitat de l'HAp per catalitzar la formació de D-riboses a partir d'amoníac, metà i aigua<sup>[14]</sup>, Kostetsky va proposar un model per a la síntesis d'ADN a partir de la interacció de diversos elements amb la xarxa cristal·lina de l'HAp que podria explicar l'origen de la vida en el planeta Terra.

A nivell teòric, Revilla *et al.* 2013<sup>[4]</sup> investigaren la formació dels biominerals HAp-ADN mitjançant eines de simulació numèrica a nivell molecular, i arribaren a la conclusió de que cadenes de B-ADN de doble hèlix poden ser encapsulades a l'interior de nanoporus d'hidroxiapatita sense sofrir deformacions importants i per tant conservant possiblement la seva funcionalitat (Figura 4-3). A més, també observaren que el procés de nucleació es basa en la formació d'un complex  $\text{Ca}^{2+}$ -ADN, al voltant del qual es produeix el creixement del cristall a mesura que els ions  $\text{PO}_4^{3-}$  de la dissolució es van incorporant a la xarxa cristal·lina.



**Figura 4-3 (a) Perspectiva equatorial d'una cadena d'ADN de doble hèlix a l'interior d'un cristall (b) Perspectiva axial de la cadena d'ADN un cop encapsulada dins de l'HAp (extret de Revilla et. al. 2013<sup>[4]</sup>)**

A nivell més pràctic, la síntesi de partícules d'HAp amb ADN es pot enfocar de dos maneres diferents. Primerament hi ha tot un grup de treballs que s'han basat en la càrrega de nanocristalls mitjançant processos d'adsorció superficial. En aquesta metodologia els nanocristalls es preparen primer sense presència d'ADN, i després es posen en contacte amb cadenes d'ADN. La forta afinitat entre HAp i ADN fa que les cadenes quedin adsorbides a la superfície dels nanocristalls. En canvi, altres treballs realitzen la precipitació *in-situ* de cristalls en presència de l'ADN amb l'objectiu de encapsular-lo.

## 4.4 Aplicacions

Com a conseqüència lògica de ser els principals elements constituents dels ossos dels mamífers, un dels camps on la hidroxiapatita mostra un potencial més gran és la biomedicina, concretament en l'enginyeria de teixits i en el camp dels nanomedicaments. No obstant, els camps d'aplicació va molt més enllà. Per exemple es pot utilitzar com a adsorbent en columnes cromatogràfiques de separació de proteïnes i ADN <sup>[17]</sup>, com a suplement nutricional en la indústria alimentària, com a additiu per a estabilitzar emulsions <sup>[19]</sup> i fins i tot s'ha investigat el seu ús per a eliminar ions pesats de l'aigua <sup>[20]</sup>. En aquest capítol es realitzarà una breu explicació de l'aplicació de la hidroxiapatita en el camp de la biomedicina, ja que és on presenta un potencial més gran.

### 4.4.1 Enginyeria de teixits

L'enginyeria de teixits és un camp multidisciplinari que té com a objectiu desenvolupar biomaterials capaços de suplantar la funció de teixits i òrgans lesionats, amb l'objectiu de facilitar la reparació i regeneració dels mateixos. Aquests biomaterials han de complir una sèrie de requisits com són: biocompatibilitat amb els teixits i fluids biològics del seu entorn, elevada porositat per facilitar la difusió de nutrients, hidrofília per facilitar la unió amb les cèl·lules de l'entorn, estabilitat estructural i elasticitat <sup>[21]</sup>.

La hidroxiapatita té un enorme potencial en la reparació i regeneració de teixits ossis ja que presenta una elevada biocompatibilitat, bioactivitat i osteoconductivitat. Això és degut a que de fet, l'os natural és un biocomposit el 70% del qual són cristalls inorgànics (majoritàriament HAp) i el 30% restant és una matriu orgànica (majoritàriament col·làgens tipus I). Els nanocristalls d'hidroxiapatita presenten una morfologia laminar i s'organitzen jeràrquicament en micro i macro estructures contingudes en fibres de col·lagen <sup>[22], [23]</sup>.

En conseqüència, s'ha dedicat un gran esforç a desenvolupar compositos artificials constituïts per col·làgens i hidroxiapatita capaços d'imitar l'estructura natural del teixit ossi, amb els eixos cristal·lins *c* dels cristalls d'HAp orientats al llarg de les fibres de col·lagen. En aquests tipus de compositos el col·lagen serveix com a suport de les cèl·lules (facilitant la seva adhesió i proliferació) mentre que l'HAp millora les seves propietats físiques i mecàniques. A més, s'ha comprovat que els scaffolds d'HAp/Col·lagen acceleren el procés d'osteogènesis <sup>[24]</sup>.



El col·lagen presenta alguns inconvenients com ara la seva ràpida degradació en un ambient biològic i la seva antigenicitat. Degut a aquests motius, recentment alguns estudis han explorat la possibilitat d'emprar composites de hidroxiapatita amb altres materials com exemple chitosan<sup>[25]</sup>, proteïnes de la seda<sup>[26]</sup>.

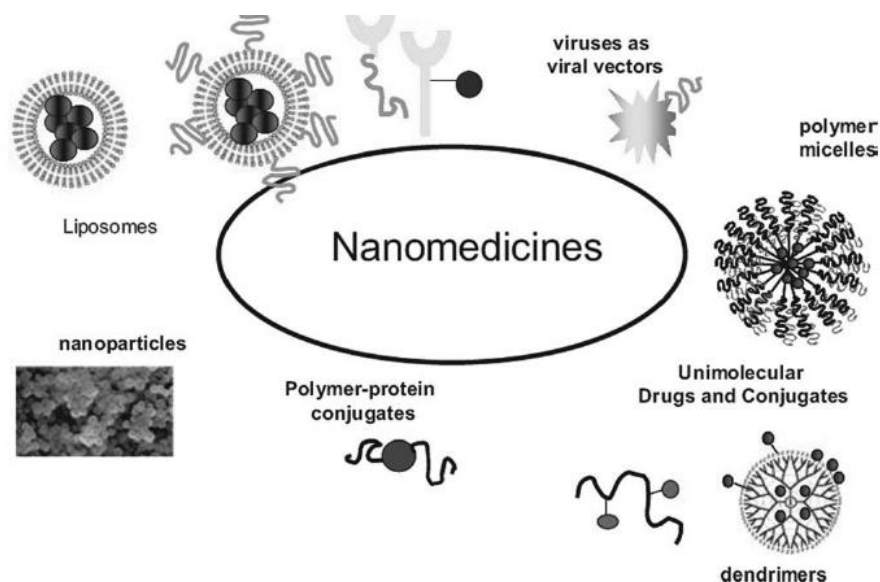
Les proteïnes de la seda són una alternativa prometedora a causa de la seva biocompatibilitat, resistència a la degradació i excel·lents propietats mecàniques. Per altre banda, el chitosan presenta una elevada osteoconductivitat, una excel·lent biocompatibilitat, baixa antigenicitat, millors propietats mecàniques i finalment una estructura similar al glicosaminoglucà present en el teixit ossi natural<sup>[21]</sup>.

#### 4.4.2 Nanomedicina

L'ús de nanotecnologia podria oferir solucions a alguns dels problemes actuals dels medicaments, com són la poca solubilitat, poca especificitat en quant a l'objectiu i escàs control de la dosificació. Per aquest motiu, s'estan dedicant molts esforços al desenvolupament de vectors per al transport de drogues a l'interior de l'organisme i fins i tot per al transport d'ADN per a la teràpia genètica. Aquests vectors permetrien a més, protegir els fàrmacs de l'entorn i retardar la seva degradació.

Són moltes les alternatives proposades: micel·les i dendrímers polimèrics, vectors virals, liposomes, hidrogels i nanopartícules inorgàniques (Figura 4 4). Aquestes últimes presenten un avantatge molt important respecte les altres alternatives: la seva mida. Al ser més petites que la resta de vectors poden penetrar l'espai extracel·lular i ser adsorbides per les cèl·lules amb més facilitat, fet que n'augmenta l'eficàcia<sup>[3]</sup>.





**Figura 4-4 Potencials vectors per a la nanomedicina** <sup>[28]</sup>

D'entre totes nanopartícules inorgàniques que es poden emprar com a vectors en la nanomedicina en destaquen les nanopartícules de CAp, que estan compostes per varies fases cristal·lines d'ortofosfats de calci com per exemple el TCP, la HAp i l'OCP. Aquests nanopartícules són capaces de penetrar a les cèl·lules i poden ser dissoltes al seu interior <sup>[28]</sup>.

Un dels seus principals avantatges sobre altres vectors és la seva excel·lent biocompatibilitat, ja que al dissoldre's no alliberen cap substància nociva i els ions  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  idealment s'incorporarien en els dipòsits naturals de hidroxiapatita de l'organisme. A més, a diferència d'altres alternatives com les nanopartícules d'òxids metàl·lics, les partícules de hidroxiapatita no indueixen cap tipus de dany a l'ADN ni comprometen la viabilitat de les cèl·lules del seu entorn <sup>[30]</sup>. No obstant, s'ha de tenir en compte que els cristalls de HAp poden produir complicacions arterioscleròtiques (deposicions indesitjades en les parets arterials) <sup>[31]</sup>. Aquest és el principal obstacle que s'ha de superar per tal de permetre l'ús clínic d'aquest tipus de nanovector.

Un altre característica de les partícules de fosfats de calci és la seva versatilitat i flexibilitat. La velocitat d'alliberació dels fàrmacs es pot regular modificant el ratio HAp/TCP i Ca/P de les nanopartícules. Això permet assolir un control de la dosificació molt més gran que amb altres nanovectors. El pH i la temperatura de reacció i els tractaments posteriors de calcinació són les principals variables amb les que es juga per afavorir o minimitzar la presència de les diferents fases <sup>[32]</sup>. També es poden modificar les propietats de les nanopartícules alterant la seva morfologia. Per exemple, la morfologia esfèrica minimitza la fricció de les partícules que es desplacen pel torrent sanguini mentre que les partícules en forma d'estelles (o agulles) tenen més facilitat per adherir-se a les cèl·lules<sup>[33]</sup>.

Les nanopartícules de ortofosfats de calci són més robustes i menys solubles en la sang que altres vectors com per exemple les micel·les i els liposomes, especialment si el ratio Ca/P és proper al de la hidroxiapatita (la sang està sobresaturada respecte la HAp). La dissolució d'aquestes partícules està afavorida a pH baixos, com els que es poden trobar en zones pròximes a tumors malignes, fet que permetria emprar aquestes partícules per a transportar fàrmacs anticarcinògens de forma molt selectiva i eficient.

El potencial de la HAp en la nanomedicina no es limita al transport de fàrmacs sinó que també s'està investigant el seu possible ús com a vector no viral per a la teràpia genètica, és a dir, per a transportar material genètic a l'interior de l'organisme. Els nanocristalls de HAp permetrien transportar l'ADN o bé adsorbit a la superfície o bé encapsulat al seu interior (on estaria protegit de l'entorn exterior <sup>[34]</sup>). La HAp no permetria assolir una eficiència de transfecció tan gran com els vectors virals <sup>[32]</sup>, però per contra no presenta els perills associats a la utilització d'un virus i per tant seria un sistema molt més segur <sup>[35]</sup>.

## 4.5 Mètodes actuals de preparació de nanopartícules de HAp

En aquest apartat es presenten els treballs de diversos autors que són representatius dels diferents mètodes que s'empren actualment per a preparar nanopartícules d'HAp.

### I) Tractament hidrotèrmic amb surfactants i citrat de sodi (Zhang *et al.* 2009) <sup>[36]</sup>

En aquest treball es sintetitzen nano i micro cristalls de hidroxiapatita mitjançant el mètode de tractament hidrotèrmic en reactor autoclau. L'ús de citrat de sodi permet complexar el calci i alliberar-lo de forma progressiva a mesura que puja la temperatura, regulant així el procés de nucleació. Modificant el pH del medi de reacció i el ratio citrat/calci s'obtenen varies morfologies ben diferenciades: nanotubs, nanoestelles, microflors, microlàmines i microesferes (Figura 4-5).

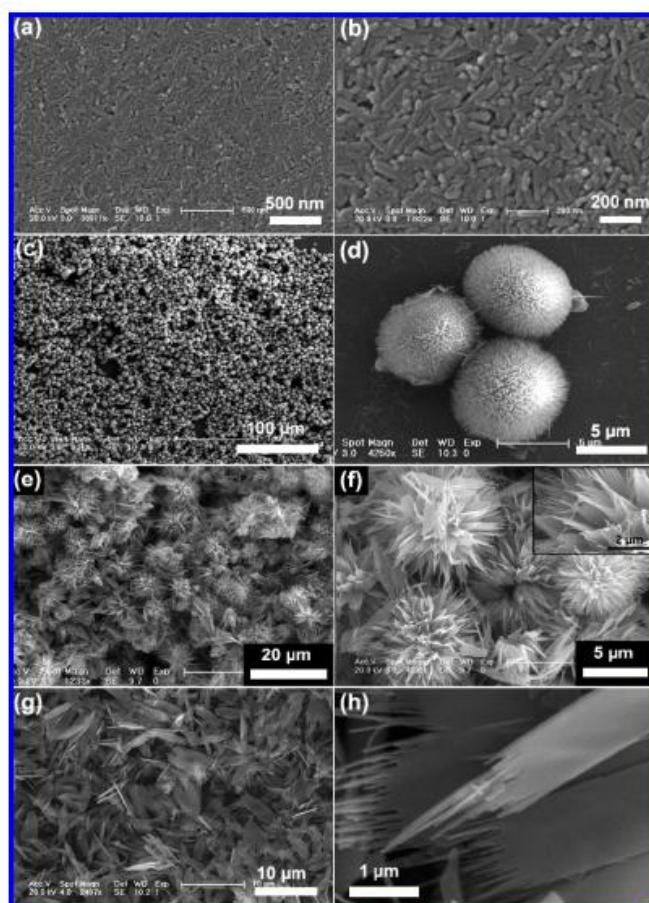


Figura 4-5 Morfologies obtingudes en Zhang *et al.* 2009 <sup>[36]</sup> (a) i (b) nanotubs, (c) i (d) esferes constituïdes per estelles, (e) i (f) microflors, (g) i (h) microlàmines.

A partir d'aquests experiments s'extreu la conclusió de que pHs elevats afavoreixen el creixement isotròpic dels cristalls. Segons una hipòtesi dels autors això es deu que augmenta l'adsorció d'ions  $\text{OH}^-$  a la superfície en creixement.

En aquest treball també s'investiga la fluorescència de la hidroxiapatita, amb l'objectiu de desenvolupar un material fluorescent de baix impacte ambiental. S'avalua la fluorescència en funció del pH de síntesi i es conclou que el màxim s'obté amb cristalls sintetitzats a pH 5. Segons els autors la fluorescència és deguda a la presència de radicals  $\text{CO}_2^\cdot$ .

## **II) Precipitació química assistida amb agents dispersants (Wang *et al.* 2010) <sup>[37]</sup>**

En aquest treball es preparen cristalls d'HAp mitjançant la reacció directa de les sals percuressores a baixes temperatures. Es sintetitzen cristalls a 40, 60 i 80°C i a pHs 8,9, 10 i 11 i s'obtenen diferents morfologies com nanotubs, nanoesferes i nanoestelles. Es conclou que les temperatures altes i els pH baixos afavoreixen el creixement anisotròpic i viceversa.

S'avaluen diferents agents dispersants com PEG, àcid cítric i etanolamina, es conclou que aquest últim és el que més afavoreix la dispersió dels cristalls.

Aquest treball també avalua l'efecte de diferents mètodes d'assecat sobre la morfologia i l'agregació final dels cristalls. Els autors conclouen que el mètode més eficient per assecar els cristalls és la liofilització, i que el mètode d'assecat al buit produeix una gran agregació i compactació de les nanopartícules.

Finalment, es proven diferents solvents: aigua, etanol i mescla aigua-etanol. No obstant, els autors no arriben a cap conclusió sobre el seu efecte en la forma dels cristalls.

### III) Síntesi en microemulsió aquosa/orgànica (Sato *et al.* 2006) <sup>[38]</sup>

En aquest treball es sintetitzen cristalls fent servir un mètode completament diferent als dos anteriors. En comptes de preparar-se en dissolució es preparen en una microemulsió en la que la fase continua és orgànica i la dispersa aquosa. Les micel·les de la fase aquosa actuen com a microreactors a l'interior de les quals van creixent els cristalls, a la vegada que els reactius van entrant al seu interior des de la fase orgànica (Figura 4-6).

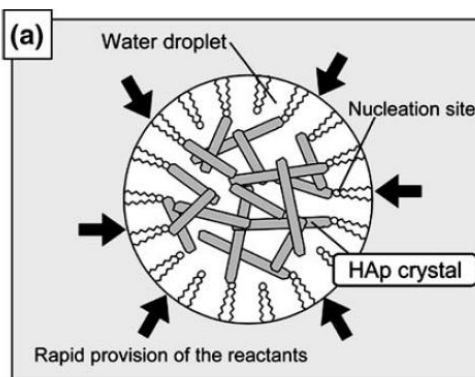


Figura 4-6. Representació de cristalls a l'interior de d'una micel·la <sup>[38]</sup>

El balanç entre la freqüència de nucleació i l'entrada de reactius als microreactors és el que determina la mida dels nanocristalls i la seva aglomeració. Els autors estudien la influència de diverses variables com la força iònica, el pH i el ratio orgànic/aquós i conclouen que una elevada freqüència de nucleació combinada amb una provisió lenta de reactius resulta en cristalls laminars molt poc aglomerats, mentre que en les condicions contràries es formen grans agregats de cristalls.

### IV) Síntesi de nanopartícules accelerada amb ultrasons (Rouhani *et al.* 2010) <sup>[39]</sup>

L'ús d'ultrasons és freqüent en molts treballs com a mètode per a resuspendre els nanocristalls després de ser assecats i per trencar agregats cristal·lins (post-síntesi). En aquest treball s'explora la possibilitat d'emprar els ultrasons durant el mateix procés de síntesi en fluid corporal simulat, amb l'objectiu de alterar la mida i forma de les partícules i disminuir el temps de preparació. Els autors observen que les nanopartícules preparades amb ultrasons són més esfèriques i de diàmetre més reduït que les preparades sense ultrasons. El diàmetre mitjà es redueix de 30 a 18 nm i la superfície específica augmenta de 63 a 107 m<sup>2</sup>/g. A més, els ultrasons també serveixen per a reduir l'aglomeració de les nanopartícules.

També s'observa que els ultrasons augmenten la velocitat de creixement dels cristalls fins a 5,5 vegades fins i tot a una temperatura tan baixa com 37°C.

#### **V) Tractament hidrotèrmic amb tamponament del pH (Ren *et al.* 2012) <sup>[40]</sup>**

La reacció de formació de la hidroxiapatita està associada a una forta caiguda del pH ja que els ions hidroxil es van incorporant en la xarxa cristal·lina de les partícules en creixement. Aquesta caiguda del pH provoca una certa heterogeneïtat en les morfologies obtingudes, que es pot evitar de dos maneres. O bé tamponant la dissolució o bé incorporant substàncies que al descomposar-se tèrmicament alliberin espècies bàsiques, com per exemple la urea.

En aquest treball els cristalls es preparen en un reactor autoclau en presència de bicarbonat de sodi com a agent tampó. S'observa que en presència d'aquesta substància i a pH neutre o lleugerament àcid s'obtenen nanotubs molt regulars i de mides molt homogènies. Els autors també conclouen que com més elevats siguin el temps i la temperatura de reacció més grans i anisotròpics seran els cristalls.

#### **VI) Síntesi per via químic-mecànica (Rhee *et al.* 2002) <sup>[41]</sup>**

En aquest treball es preparen cristalls seguint el mètode de síntesi químic-mecànica. Aquest mètode consisteix en mesclar i homogeneïtzar mecànicament les sals percussores de la hidroxiapatita (en aquest cas  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  i  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) mentre es sotmeten a una gran pressió: primer a 1.3-2,5 MPa i després a 200 MPa (durant aquesta segona etapa de compressió s'han de refrigerar les mostres). Posteriorment, es sotmeten els cristalls a temperatures molt elevades de entre 1000 i 1200 °C amb l'objectiu d'augmentar-ne la mida.

Amb aquest mètode la cinètica de la reacció és més ràpida degut a l'absència d'aigua <sup>[42]</sup>. Un altre avantatge és que s'assoleix un gran control de l'estequiometria. No obstant, com que les temperatures són tan elevades es corre el risc d'obtenir altres fases secundàries com  $\beta$ -TCP o  $\alpha$ -TCP si el ratio Ca/P no es fixa exactament a 1,667. Altres inconvenients són que no es poden obtenir morfologies regulars i homogènies, i que resulta també impossible obtenir cristalls dispersos (estaran en forma d'enormes aglomeracions) <sup>[43]</sup>

## 4.6 Variables que afecten la morfologia dels nanocristalls

Aparentment la preparació dels nanocristalls d'hidroxiapatita no és un procés complicat ja que la reacció química entre les sals perussores és molt ràpida, l'equilibri està completament desplaçat cap als productes i a més l'HAp és molt més estable termodinàmicament que qualsevol altre sal del grup d'ortofosfats de calci. No obstant, l'autèntic repte rau en sintetitzar cristalls de morfologia i mida controlades. Fins i tot si l'estudi de la morfologia es limita a la simple precipitació en medi aquós sense presència de additius aquest segueix estant poc clar i relativament poc controlat a dia d'avui. El creixement d'aquests nanocristalls no és tan sols extremadament sensible a les variacions més suaus de les condicions experimentals si no que a més es veu molt afectat per altres factors com la presència de impureses (depenent de la quantitat i naturalesa d'aquestes), la textura dels reactius i dels recipients emprats com a reactors i variables de naturalesa estadística impossibles de controlar.

La recerca bibliogràfica realitzada ha servit per fer un recull d'algunes de les variables més importants amb les que es treballa per a modificar la morfologia dels nano cristalls de hidroxiapatita (Taula. 4-2). S'ha de tenir en compte però, que aquesta llista no és exhaustiva, i que tan sols recull les variables mencionades en els articles de la bibliografia consultats.

Taula. 4-2 Variables que afecten la morfologia dels nanocristalls d'HAp

Variables
pH
Temperatura reacció i d'envelliment
Solvent
Mode d'addició solucions
Surfactants (tipus i quantitat)
Complexant del calci
Temps de reacció i d'envelliment
Mètode assecat
Aq/Org ratio (en emulsió)

A continuació s'explica quin és l'efecte que té cada un d'aquestes variables (segons es reporta en la bibliografia). S'ha de tenir en compte però, que aquesta llista no és exhaustiva



**pH:** l'acidesa del medi de reacció és aparentment un dels factors que més influència tenen sobre la morfologia de la hidroxiapatita. Un pH elevat afavoreix morfologies molt isotròpiques (tendint a formes esfèriques) i mides molt reduïdes, mentre que a pHs baixos s'obtenen cristalls grans i molt anisotròpics (tendint tubulars o fibril·lars <sup>[36], [37], [40], [44]</sup>. No obstant, s'ha de tenir en compte que a pHs entre 4 i 5 el creixement de l'HAp no està afavorit termodinàmicament (s'obtenen altres sals d'ortofosfat de calci) i que a pH inferior a 4 la hidroxiapatita es dissolt completament <sup>[1]</sup>.

És important mencionar el fet de que en condicions normals el pH no es manté constant durant el procés de cristal·lització sinó que experimenta un pronunciat descens associat a l'entrada de ions hidroxils a la xarxa cristal·lina <sup>[45]</sup>. Aquesta variabilitat de pHs dificulta el control de la morfologia i afavoreix la coexistència de nanocristalls de formes diverses en una mateixa mostra. Per reduir aquesta variabilitat es pot treballar en dissolucions tamponades o bé introduir substàncies com la urea que al descompondre's (per efecte de la temperatura) allibera  $\text{NH}_3$  i atenua l'augment de l'acidesa <sup>[46]</sup>.

Per últim, l'efecte del pH sobre la morfologia es manté també en les reaccions de cristal·lització en micro-emulsió aquosa/orgànica <sup>[47]</sup>.

**Temperatura:** la temperatura també té un efecte important sobre l'isotropia dels cristalls. Temperatures elevades afavoreixen les formes allargades (anisotròpiques), mentre que a temperatures baixes es tendeix a la formació d'esferes (formes isotròpiques) <sup>[37], [47]</sup>. A més, els tractaments de calcinació a elevades temperatures (fins a 1000°C) poden contribuir a augmentar la mida dels cristalls, a disminuir la seva superfície específica i també poden afectar l'aglomeració dels cristalls.

**Solvent:** com més reduïda sigui la solubilitat en el medi, més ràpidament s'arribarà a la sobresaturació i per tant més ràpida serà la precipitació. Al seu torn una ràpida precipitació es tradueix en la formació majoritària d'agregats amorfs (no cristal·lins) esferoïdals <sup>[37], [48]</sup>. Així doncs, l'ús de solvents en els que la solubilitat de l'HAp, sigui més reduïda que en l'aigua (per exemple etanol) afavoreix formes més isotròpiques. Addicionalment els cristalls produïts també tindran tendència a estar molt més agregats (per compensar la major energia interfacial).



**Mode d'addició:** la velocitat d'addició dels reactius afecta el procés de nucleació i en conseqüència la morfologia final obtinguda <sup>[40]</sup>. En la majoria de mètodes descrits en la literatura es realitza l'addició de la solució de  $\text{PO}_4^{3-}$  sobre la de  $\text{Ca}^{2+}$ ; si aquesta addició es realitza de cop s'afavoreix una ràpida sobresaturació i formes amb tendència a l'esfericitat (isotròpiques), mentre que si es realitza gota a gota la morfologia obtinguda tendeix a ser més anisotròpica.

**Presència de surfactants:** s'adhereixen a la superfície del cristall en creixement i interaccionen amb els ions que es van incorporant a la xarxa <sup>[36], [44], [47], [50]</sup>. No obstant, sembla que un cop es netegen els cristalls els surfactants són eliminats i no es detecten mitjançant FTIR <sup>[38], [49]</sup>.

**Presència d'agents complexants del calci:** agents capaços de complexar el calci com ara l'àcid tartàric i l'àcid cítric alenteixen el procés de nucleació i poden disminuir la tendència dels cristalls a aglomerar-se <sup>[36], [50]</sup>.

**Temps de reacció i d'envelliment:** segons la bibliografia consultada <sup>[40]</sup>, un temps de reacció major implica cristalls de dimensions més elevades.

**Mètode d'assecat:** el mètode d'assecat pot influir tan en la mida dels cristalls com en l'agregació dels mateixos. Segons la bibliografia consultada <sup>[44]</sup> les partícules assecades al buit són més petites i esfèriques que les assecades per liofilització i a més presenten una aglomeració molt major.

**Ratio fase orgànica/fase aquosa en microemulsió:** la relació entre les fases orgàniques i aquosa afecta la mida de les micel·les i altera la morfologia dels cristalls. Si augmenta la relació orgànic/aquós la morfologia tendeix a laminar i en cas contrari a tubular <sup>[38]</sup>.

## 5. Materials

### 5.1 Reactius

- Aigua desionitzada miliQ®
- Etanol (96% v/v)
- Nitrat de calci ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
- Sal amònica de fosfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ )
- Amoníac aquós ( $\text{NH}_3$  30% v/v)
- Àcid nítric ( $\text{HNO}_{3(\text{aq})}$ )
- Àcid clorhídric ( $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ )
- Clorur de sodi ( $\text{NaCl}$ )
- Citrat trisòdic ( $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ )
- EDTA ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ )
- Surfactant CTBA (Bromur de hexadeciltrimetilamoni,  $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ )
- Trietanolamina  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$
- Ciclohexà ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ )
- Hidròxid de calci ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )
- Hidròxid de sodi ( $\text{NaOH}$ )
- ADN d'esperma de salmó (d'alt pes molecular)
- Enzim nucleasa (400 kunitz/mg)
- Plasmidi pUC 19 de E. Coli (amb anell resistència a l'ampicil·lina)
- *Escherichia Coli* (soca DH 5α)
- Bromur d'etidi
- Ampicil·lina.
- Medi cultiu (LB agar)
- Dihidrogen fosfat de potassi ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Agarosa
- Dissolució tampó Tris-fosfat-EDTA per a electroforesi (0,8 M Tris fosfat, pH. 8,0, 0,02 M EDTA)
- Surfactant AOT (Docusat de sodi,  $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NaO}_7\text{S}$ )
- Monoetanolamina ( $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$ )

També s'han de considerar les dissolucions emprades en la purificació del plasmidi (apartat 6.3.1), que formen part del QIaprep® Spin Miniprep kit (Taula 4-1), subministrat per QIAGEN.

**Taula 5-1. Dissolucions contingudes en el QIaprep Spin Miniprep kit per a la purificació del pUC19**

<b>Tampó</b>	<b>Composició</b>
Tampó de resuspensió (R3)	Tris-HCl 50 mM, pH 8 EDTA 10 mM
RNase A	RNase 20 mg/cm <sup>3</sup> en R3
Tampó de lisis (L7)	NaOH 0,2 M SDS 1% (pes/v)
Tampó d'equilibrament	acetat de potassi 0,1M, NaCl 0,6 M, pH 5 Triton®X-100 0,15% (v/v)
Tampó de precipitació (N3)	acetat de potassi 3,1 M, pH 5,5
Tampó de rentat (E4)	acetat de sodi 0,1 M, pH 5 NaCl 825 mM
Tampó d'elució (E4)	Tris-HCl 100 mM, pH 8,5 NaCl 1,25 M
Tampó de precipitació (N3)	acetat de potassi 3,1 M, pH 5,5

## 5.2 Equips

- TEM: Philips TECNAI 10 (80 kV en mode lluminós) i càmera digital SIS MegaView II
- SEM: GEMINI SEM amb filament d'emissió de camp Shottky 4pA-20nA, 0.1-30 kV resolució de 1,1 nm a 20 kV.
- Espectrofotòmetre FTIR: FT/IR-4100 //ATR ESPECAC de la marca Jasco
- Espectrofotòmetre UV: SHIMADZU UV-3600 de doble feix
- Centrífuga
- Equip de electroforesi
- Autoclau per l'esterilització
- Equip de desionització de l'aigua miliQ®
- Campana d'extracció de gasos
- Ph-metre
- Liofilitzador
- Càmera digital (per l'electroforesi)
- Reactor autoclau: Berghof Digestec™ pressure digestion system DAB-2
- Agitador orbital
- Placa calefactora

## 6. Mètodes de preparació dels cristalls

### 6.1 Preparació de nanocristalls de hidroxiapatita

#### 6.1.1 Procediment per a la preparació de nanocristalls a baixes temperatures

Es prepara una dissolució <sup>[1]</sup> de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,3 M en aigua desionitzada milipore i s'ajusta el pH al valor que correspongui mitjançant l'addició d' $\text{NH}_3$  aquós (30% v/v) gota a gota, la regulació del pH es realitza amb l'ajuda d'un pH-metre. A continuació es prepara una dissolució [2] de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.3 M també en aigua desionitzada i s'ajusta el pH al mateix valor que la solució anterior. La dissolució [1] es sotmet a agitació (400 rpm) amb l'ajuda d'un agitador magnètic i s'escalfa fins a la temperatura desitjada de reacció, en aquest punt s'afegeix l'agent dispersant (mono o trietanolamina) en una proporció del 2% en massa. La temperatura i el pH s'elegeixen en funció de la morfologia que es vol preparar (veure apartat 8.1)

La dissolució [2] s'addiciona sobre la [1]. És recomanable pre-escalfar la solució 2 per tal de minimitzar la baixada de temperatura. Immediatament després de l'addició s'observa que el medi de reacció esdevé blanquinós i el pH experimenta una baixada brusca.

Es deixa que la mostra reaccionï durant 1h i 30 minuts mantenint agitació i temperatura constant i després es deixa que els cristalls s'envelleixin en el medi de reacció a temperatura ambient durant 24 h. Passat aquest temps es separen els cristalls per centrifugació i es netegen amb aigua desionitzada (x2). Finalment els cristalls es congelen i s'assequen en el liofilitzador

S'ha observat que el filtrat al buit no és un mètode adequat per a separar els cristalls del medi de reacció, ja que les dimensions d'aquests són tan reduïdes que obturen els porus del paper de filtre. També s'ha comprovat que no es convenient assecar els cristalls en un forn ja que aquests es compacten i després la seva resuspensió resulta molt complicada.

Aquest procediment s'ha extret de Wang et. Al. 2010 <sup>[37]</sup> però s'han introduït algunes modificacions.

### 6.1.2 Procediment per a reacció en reactor autoclau a altes temperatures

Aquest procediment s'ha extret de Zhang *et al.* 2009 <sup>[36]</sup> i s'han introduït algunes modificacions per tal d'adaptar-lo al material i instal·lacions disponibles. Els passos seguits es descriuen a continuació.

Es prepara una dissolució [1] afegint 2 mmol de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  i 0.2 g CTAB en 20 cm<sup>3</sup> de agua miliQ. S'ajusta el pH a 4,5 amb  $\text{HNO}_3$  aquós amb l'ajuda d'un pH-metre. Es prepara també una dissolució [2] addicionant 2 mmol de citrat de sodi i 1.2 mmol de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  en 15 cm<sup>3</sup> de agua miliQ. Es sotmet la dissolució 1 a agitació durant 30 minuts (400 rpm) i s'afegeix de cop la solució 2, seguidament es manté l'agitació durant 30 minuts més.

Passat aquest temps s'introdueix la mescla en un tub de tefló i aquest s'insereix en el reactor autoclave (Figura 6-1). Es col·loca un disc d'alumini entre el reactor i el disc de ruptura per prevenir-ne la corrosió, i es procedeix a segellar el reactor amb l'ajuda d'una baioneta (s'ha de regular el moment de torsió a 25 N·m).

Per a poder transmetre calor al reactor, aquest s'introdueix en un adaptador que encaixa amb la placa magnètica i es fixa la temperatura de reacció. Alhora de fixar la temperatura és important tenir en compte que la pressió que s'assolirà a l'interior del reactor és funció de la temperatura. El disc de ruptura està tarat a 200 bar, i en cas de que es superés aquesta pressió s'alliberaria tot el contingut en forma de vapor (que pot contenir àcid nítric).

Un cop que el reactor està segellat i col·locat sobre la placa, es deixa que la reacció transcorri durant 24 h a 180°C (sempre a l'interior d'una vitrina de gasos). Passat aquest temps es deixa que el contingut es refredi abans de tornar a obrir el reactor (es recomanable esperar més de 2 hores i retirar-lo del adaptador de la placa calefactora per a disminuir la inèrcia tèrmica) .

Els cristalls es separen del medi per centrifugació i es renten primer amb etanol (per solubilitzar i eliminar el CTBA) i després amb aigua desionitzada. Finalment es congelen i s'assequen per liofilització.



Figura 6-1. Reactor autoclau emprat en aquest treball

### 6.1.3 Procediment per a preparació de nanocristalls en micro-emulsió.

Aquest procediment s'ha extret de Sato *et al.* 2006<sup>[38]</sup> i s'han introduït algunes modificacions per tal d'adaptar-lo al material i instal·lacions disponibles. Els passos seguits es descriuen a continuació.

Es prepara una suspensió aquosa de 100 mmol de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en 3  $\text{cm}^3$  d'aigua desionitzada. Es preparen també 3  $\text{cm}^3$  una dissolució 60 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i una mescla de 10.5 g de surfactant AOT en 28  $\text{cm}^3$  de ciclohexà ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ ),

A continuació es sotmet la mescla orgànica a una intensa agitació (800 rpm), s'addiciona la suspensió de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , i es segueix agitant durant una hora abans de afegir la dissolució aquosa de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . La reacció transcorre durant 24 hores a temperatura ambient i mantenint la velocitat d'agitació. Passat aquest temps es separen els cristalls amb la centrifuga, abans però, és necessari destruir l'emulsió mitjançant l'addició d'un volum equivalent d'etanol. Els cristalls es netegen amb etanol (x2) i aigua desionitzada (x2), es congelen i s'assequen per liofilització.

## 6.2 Mètodes emprats per a la encapsulació d'ADN d'esperma de salmó.

### 6.2.1 Precipitació química a baixes temperatures en presència d'ADN.

El procediment descrit a continuació està basat en el descrit en l'apartat 6.1.1 però introduint-hi algunes modificacions necessàries al tenir lloc ara la reacció en presència d'ADN.

Es preparen 50 cm<sup>3</sup> d'una dissolució [1] de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,3 M en aigua desionitzada milipore i s'ajusta el pH a 10 mitjançant l'addició d' $\text{NH}_3$  aquós (30% v/v). La regulació del pH ara es realitza amb l'ajuda de paper de pH i no amb un pH-metre, ja que l'ADN es podria quedar enganxat a l'elèctrode de vidre. Seguidament s'afegeixen 0.1 g d'ADN d'esperma de salmó i s'agita a 400 rpm durant 1 h; aquest període d'incubació serveix per a que es pugui formar el complex  $\text{Ca}^{2+}$ -ADN.

A continuació es preparen 30 cm<sup>3</sup> d'una dissolució [2] de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.3 M també en aigua desionitzada i s'ajusta el pH al valor desitjat (en funció de la morfologia desitjada). No s'afegeixen dispersants de la família de les etanolamines per evitar possibles contaminacions que dificultessin la detecció de l'ADN en els nanocristalls (ambdues espècies contenen el grup amina).

La dissolució [1] s'escalfa fins a una temperatura de 40°C i s'hi afegeix de cop la dissolució [2]. Es deixa que reaccioni durant 10 minuts i a continuació es puja la temperatura fins la temperatura desitjada per a el control de la morfologia. El motiu d'aquest canvi de temperatures és que s'inicia la reacció a una temperatura baixa que minimitzi la degradació de l'ADN i quan presumiblement part d'aquest ADN ja es troba encapsulat és possible pujar la temperatura.

Al cap de 1h i 30 min es para la calefacció i es deixa que els cristalls envelleixin tota la nit. Després es separen del medi de reacció per centrifugació i es netegen amb una dissolució aigua-etanol al 50% v:v (per eliminar part de l'ADN adsorbit a la superfície) i amb aigua desionitzada (x2). Finalment es congelen i s'assequen al buit.

En una variant d'aquest experiment, és possible dissoldre l'ADN en la dissolució de fosfats en comptes de la de calci.



### 6.2.2 Reacció a altes temperatures en reactor autoclau en presència d'ADN.

El procediment per a preparar partícules HAp-ADN en el reactor autoclau és semblant al descrit en l'apartat 6.1.2, però afegint l'ADN (0,1 g) en la dissolució percussora del calci. S'ha de tenir en compte que la quantitat màxima de matèria orgànica no pot superar els 0,8 g (per les característiques del reactor autoclau emprat).

Una altre diferencia és que la regulació del pH no es pot realitzar amb l'elèctrode de vidre i per tant s'ha de fer amb paper indicador. Finalment, els cristalls també s'han netejat amb una dissolució aigua-etanol.

**Nota important:** tan en el procediment de l'apartat 6.2.1 com en el d'aquest apartat (6.2.2) s'ha d'emprar sols material de plàstic ja que l'ADN es podria quedar enganxat al vidre a causa de les interaccions amb els grups silicats.

### 6.2.3 Eliminació de l'ADN superficial

Al realitzar la reacció de formació de l'HAp en presència d'ADN, no tot quedarà encapsulat a l'interior dels cristalls, si no que una gran part d'aquest ADN quedarà adsorbit a la superfície cristal·lina gracies a les interaccions que s'estableixen entre els grups fosfats i els ions calci. La presència d'aquest ADN superficial generar confusions, ja que mitjançant les tècniques analítiques disponibles (IR, UV, XPS) també serà detectat i podria ser confós amb l'ADN encapsulat. Així doncs, per tal de poder verificar que realment s'ha dut a terme l'encapsulació, ha sigut necessari desenvolupar un mètode que permetés eliminar l'ADN adsorbit.

En un primer intent, s'ha optat per a netejar els cristalls amb mescles aigua-etanol (<70% v:v) i amb una dissolució tampó de fosfats pH=7, que se sol utilitzar de forma habitual per a eluir ADN de columnes de purificació constituïdes d'hidroxiapatita, però per tal de disposar d'evidències més fermes que permetessin diferenciar l'ADN encapsulat del possible ADN adsorbit a la superfície s'ha optat per a realitzar un segon tractament que consisteix en netejar els cristalls d'hidroxiapatita amb una dissolució d'enzims capaços de digerir l'ADN (*Desoxorribonucleasa I* *provinent de pàncrees boví* >400 Kunitz units/mg). En aquest procediment els cristalls es resuspenen en aigua desionitzada (0,5 mg/cm<sup>3</sup>) s'hi afegeixen 5 mm<sup>3</sup> de la dissolució d'enzims nucleasa (>2000 kunitz/cm<sup>3</sup>) i es col·loca la mostra en un agitador orbital a 37°C durant 30 minuts. Finalment es separen els cristalls per centrifugació i es netegen amb aigua miliQ® (x2).

## 6.3 Encapsulació de plasmidi funcional pUC19 i transfecció.

### 6.3.1 Cultiu i purificació del plasmidi pUC19.

Les bactèries *E.Coli* competents (sense paret cel·lular) han sigut transfectades amb una mostra de pUC19 pur (plasmidi que conté un gen de resistència a l'ampicil·lina) i sembrades sobre plaques petri. Després de 24 hores de creixement es pica una colònia i s'introdueix en un medi de cultiu líquid LB (10 g/dm<sup>3</sup> d'extracte de llevat, 5 g/dm<sup>3</sup> de NaCl i 16 g/dm<sup>3</sup> de peptona dissolts en aigua destil·lada pH 7,2). Aquest cultiu s'ha de fer de manera esglaonada, primer en 10 cm<sup>3</sup> de medi i posteriorment en 250 cm<sup>3</sup>, ja que en cas contrari les bactèries estarien sotmeses a un estrès massa gran i no es reproduirien. Es deixa el medi de cultiu en un agitador orbital a 37°C durant 24 hores.

A continuació s'ha d'extreure l'ADN plasmídic de l'interior dels bacteris i purificar-lo. Les dissolucions emprades en aquest procés s'indiquen seguint la mateixa nomenclatura que en el kit de QIAGEN (l'empresa subministradora). Les seves composicions es poden consultar en la Taula 5-1.

El primer pas de la purificació és separar els bacteris del medi de cultiu mitjançant la centrifuga. Un cop recuperats els bacteris, es resuspenen en 10 cm<sup>3</sup> d'un tampó R3 (veure la taula 3) que conté un enzim capaç de digerir tot l'ARN present. Seguidament s'afegeixen 10 cm<sup>3</sup> d'un tampó de lisis (L7) que serveix per a destruir la paret cel·lular, en afegir el tampó L7 s'agita suaument la mostra (no es pot emprar un vortex ja que es podria trencar el plasmidi). A continuació s'afegeixen 10 cm<sup>3</sup> de tampó de precipitació N3, en aquest pas les proteïnes presents es desnaturalitzen i poden ser eliminades per centrifugació (>15000 g durant 10 minuts). Es recupera el sobrenedant, s'introdueix en una columna de purificació i es deixa fluir per gravetat. Es neteja la columna amb 60 cm<sup>3</sup> tampó de rentat W8 i finalment s'elueix el plasmidi amb 15 cm<sup>3</sup> de tampó d'elució E4.

L'ADN purificat ara està en solució juntament amb diverses espècies iòniques que han de ser eliminades per tal d'evitar que aquestes interfereixin en la reacció d'encapsulació. Per exemple, és especialment important assegurar-se de que no queden impureses d'EDTA ja que a causa de la seva elevada tendència a complexar-se amb el calci dificultarien la reacció de formació dels cristalls d'hidroxiapatita. Aquestes espècies iòniques es poden eliminar mitjançant una diàlisi. Per a dur a terme la diàlisi s'introdueix la dissolució amb l'ADN plasmídic en un saquet constituït per la membrana de diàlisi i aquest es submergeix en un recipient amb aigua desionitzada on s'aplica una agitació suau i constant (uns 300 rpm). El procés dura aproximadament 24 h i cal renovar l'aigua almenys tres cops.

Un cop finalitzada la diàlisi es congela la mostra i s'asseca per liofilització. Per a quantificar el plasmidi obtingut, es resuspèn en un volum conegut i es recull l'espectre UV-visible.

### **6.3.2 Preparació de les partícules HAp-pUC 19 (encapsulació de pUC19)**

Es resuspenen els 800 µg de plasmidi cultivat en 5 cm<sup>3</sup> d'una dissolució aquosa de nitrat de calci 0,3 mol/dm<sup>3</sup> i es basifica fins a pH 10. Seguint un procediment semblant al descrit en l'apartat 6.2.1 en cada alíquota s'hi afegeixen 1,5 cm<sup>3</sup> de dissolució aquosa de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 M al mateix pH i es deixa que la mostra reaccionï primerament a 40°C durant 10 minuts i a continuació 1 h i 30 min a 80°C (en un bany maria). Es deixa que els cristalls envelleixin a temperatura ambient durant tota la nit i es separen del medi de reacció per centrifugació. Es netegen de forma successiva amb aigua desionitzada i amb una solució aigua-etanol al 50% en volum, i finalment s'assequen per liofilització.

### 6.3.3 Transfecció a bactèries competents i validació amb electroforesi

Les bactèries competents han de ser sotmeses a un tractament de xoc tèrmic per a desestabilitzar la membrana cel·lular i forçar la incorporació de les nanopartícules carregades. Després d'un bany de gel de 30 minuts s'afegeixen a l'eppendorf les partícules HAp-pUC 19 resuspeses en aigua miliQ ( $0.05 \text{ mg/mm}^3$ ). Seguidament s'escalfen en un bany maria a  $42^\circ\text{C}$  durant 5 minuts i immediatament després es refreden en el bany de gel. A continuació s'afegeix una petita quantitat de medi de cultiu que conté ampicil·lina i es deixa incubar en un agitador orbital a  $37^\circ\text{C}$  durant 1 h. Aquesta transfecció es realitza per duplicat. Per una banda amb una alíquota sotmesa al rentat enzimàtic superficial i per altre banda amb una alíquota no sotmesa al tractament amb enzim nucleasa.

Passat el temps d'incubació es procedeix a sembrar les bactèries en plaques de medi sòlid agar. Es sembra una placa amb ampicil·lina i una sense. A més també es prepara un control negatiu (bactèries sense el plasmidi en LB+ampicil·lina) i un control positiu (bactèries transfectades directament amb el pUC19 en LB+ampicil·lina).

Al cap de 24 hores es pica una colònia de la placa i s'introdueix en un medi de cultiu líquid amb la finalitat d'amplificar el plasmidi presumiblement expressat a l'interior de les bactèries. Es cultiva i es purifica el plasmidi seguint el mateix procediment descrit en l'apartat 6.3.1, i finalment es realitza una electroforesi amb el material genètic recuperat (el procediment detallat està explicat en l'apartat 7.6). L'objectiu d'aquesta electroforesi és confirmar que les bactèries que han crescut en les plaques de cultiu efectivament són bactèries competents transfectades (és a dir, contenen el pUC19) i no contaminacions provinents de l'ambient.

## 7. Tècniques de caracterització dels cristalls.

### 7.1 Microscòpia electrònica SEM/TEM

La caracterització de la morfologia dels cristalls sintetitzats s'ha realitzat mitjançant microscòpia electrònica de transmissió (TEM) i d'escombratge (SEM) .

En la microscòpia electrònica de transmissió la imatge es forma a causa de les interaccions que pateixen els electrons al travessar la mostra. Els electrons són primerament emesos per una font que sol ser un filament de tungstè i accelerats mitjançant l'aplicació d'un elevat voltatge (40-100 kV). El feix d'electrons és enfocat sobre la mostra mitjançant unes lents magnètiques condensadores que també permeten regular-ne la intensitat.

El sistema d'imatge està format per les lents: objectiu, difractora, intermèdia i projectora, que conjuntament produeixen la imatge final de la mostra. L'obtenció de la imatge visible a partir de la electrònica es realitza gràcies a una pantalla recoberta de material fluorescent que al ser irradiada per electrons emet llum en l'espectre visible.

A diferència de la TEM, la tècnica SEM es basa en que el feix d'electrons no travessa la mostra si no que rebota en la seva superfície. Quan els electrons xoquen contra la superfície (prèviament recoberta amb una fina capa de carboni per proporcionar-li propietats conductores), s'allibera una gran quantitat d'energia en forma de calor, fotons, llum visible electrons retrodispersats i electrons secundaris, aquests últims són comunament utilitzats per a generar una imatge que permet determinar la morfologia de la mostra.

La preparació de les mostres és també diferent en els dos casos. Per al TEM, és necessari preparar primer una reixeta metàl·lica recoberta d'una fina pel·lícula de carboni. La mostra en suspensió es col·loca sobre la reixeta amb l'ajuda d'una micropipeta i es deixa que la gota s'evapori alhora que els cristalls es disposen sobre la pel·lícula de carboni. En el cas del SEM, les mostres es situen sobre un portamostres (també amb l'ajuda d'una micropipeta) i posteriorment es recobreixen amb la pel·lícula de carboni.

Tan per al SEM com per al TEM, a l'hora de treballar amb hidroxiapatita, convé que la suspensió no sigui gaire concentrada ja que si no es formen una gran quantitat d'agregats que dificultaran l'observació dels cristalls individuals. Per contra tampoc convé que la mostra estigui massa diluïda ja que en aquest cas esdevé complicat localitzar poblacions de cristalls en la reixeta. A efectes pràctics, s'ha observat que resuspendre entre 0,5 i 1 mg per  $\text{cm}^3$  proporciona bons resultats. Per últim, si en la resuspensió es poden apreciar agregats cristal·lins (a simple vista) convé trencar-los amb sonicació amb ultrasons (les sonicacions han de ser curtes i intermitents perquè si no l'escalfament podria afectar la morfologia dels cristalls).

## 7.2 Raigs X (XDR)

La difracció de raigs X és una tècnica física que proporciona informació sobre l'estructura dels materials cristal·lins. Aquesta tècnica es basa en la interacció dels raigs X, que tenen una longitud d'ona comparable a les dimensions atòmiques, amb els electrons dels àtoms de l'estructura cristal·lina.

Un generador d'alta tensió provoca una diferència de potencial entre un filament incandescent i un metall pur (de coure o molibdè) i com a resultat s'estableix un corrent d'electrons lliures. Des del filament incandescent (càtode), salten electrons cap el ànode provocant una reorganització electrònica en els seus nivells d'energia. Al restablir-se el nivell energètic dels electrons excitats de l'ànode s'emeten raigs X d'una freqüència exactament igual al salt d'energia concret (quantificat) que necessiten aquests electrons per a tornar al estat inicial. La longitud d'ona característica és un dels paràmetres més importants en la difracció de raigs X i depèn del metall emprat, en el cas del coure és de 0.154 nm.

Quan els raigs X travessen el material estudiat, es produeix el fenomen de difracció. Els raigs segueixen camins òptics de diferents longituds i per tant es produeix un desfasament, si la diferència de camins òptics és un múltiple enter de la longitud dona les diferents ones estan en fase. En un cristall la diferència de camins òptics entre àtoms situats en posicions equivalents en diferents cel·les és  $2 \cdot d_{hkl} \sin(\theta)$  on  $d_{hkl}$  és la distància entre els plans cristal·logràfics  $hkl$  que donen lloc a la difracció i  $2\theta$  l'angle que formen entre sí les radiacions incident i emergent. La llei de Bragg es pot formular com:

$$2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda \quad (\text{Eq. 7-1})$$

Mitjançant l'expressió anterior (Eq. 7-1), es pot calcular el valor de  $d_{hkl}$ . Aquest valor també es pot calcular amb unes expressions algebraiques que depenen de l'estructura de la cel·la unitària, per tant l'estructura del cristall estudiat es pot determinar seguint un procés iteratiu que consisteix en comparar el valor  $d_{hkl}$  deduït de la llei de Bragg amb el valor de  $d_{hkl}$  calculat amb les diferents expressions algebraiques.

En aquest treball no ha sigut necessari seguir aquest procediment iteratiu ja que l'estructura cristal·lina de l'HAp ja ha estat molt estudiada. En lloc d'aplicar la llei de Bragg, s'ha emprat la comparació directa del gràfic *Intensitat vs angle 2θ* d'una de les mostres sintetitzades al laboratori amb els pics característics reportats en la bibliografia (A.S.T.M. card No. 9-432).

La recollida del espectre de les mostres no s'ha realitzat a les pròpies instal·lacions del departament si no que s'han adquirit com a servei extern al *Centre Científic i tecnològic de la UB*.

### 7.3 Espectroscòpia FTIR

L'IR és una tècnica de caracterització fisicoquímica que es basa en el fet de que els moviments de rotació i vibració moleculars tenen nivells d'energia discrets (és a dir, freqüències determinades). Aquestes vibracions sempre es produiran en un enllaç entre àtoms a temperatura superior al 0 absolut i poden ser o bé de tipus tensió o de tipus flexió. Les vibracions de tensió impliquen un canvi continuu en la distància entre àtoms al llarg de l'eix de l'enllaç, mentre que les de flexió es caracteritzen per la variació de l'angle format per dos enllaços. Al seu torn, les vibracions de flexió poden ser del tipus balanceig, torsió, aleteig o tisorada.

Per a obtenir l'espectre d'infraroig d'una mostra, el raig ha de travessar-la. Quan la freqüència de vibració dels enllaços de la molècula coincideixen amb les dels rajos es produeix l'absorció, i el que es mesura és la quantitat d'energia absorbida per a cada longitud d'ona.

Així doncs, l'espectre IR d'un compost consisteix en una representació gràfica de l'absorció en funció de la longitud d'ona, i la identificació dels grups funcionals es realitza basant-se en que cada grup presenta una absorció característica en una longitud d'ona determinada. La zona de l'espectre situada entre  $1300$  i  $400\text{ cm}^{-1}$ , presenta una sèrie de bandes de difícil identificació.

Actualment casi tots els espectrofotòmetres emprats són FTIR (Fourier Transform Infrared). En aquest tipus de IR, en comptes de variar la freqüència d'un feix de radiació monocromàtica es genera un feix que conté totes les longituds del rang utilitzat. Mitjançant un interferòmetre es genera aquest feix policromàtic que es fa incidir sobre la mostra i després es recull com a senyals d'interferències (interferograma). Finalment s'aplica l'operació matemàtica de transformada de Fourier per a obtenir l'espectre. L'esquema que segueix un espectrofotòmetre FTIR es pot observar en la Figura 7-1.

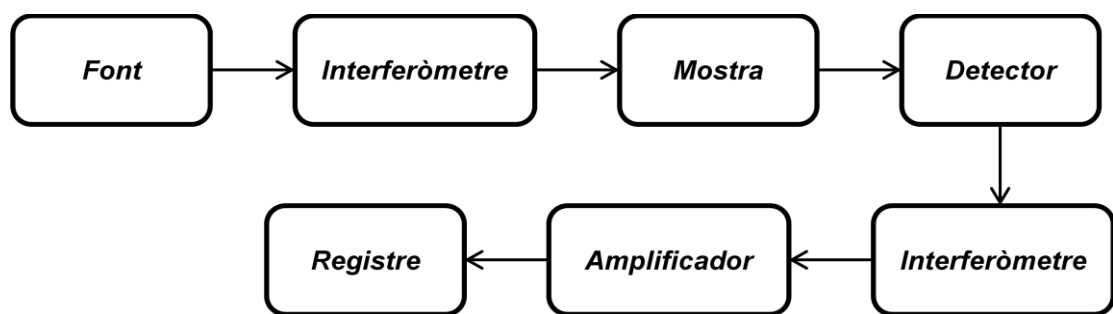


Figura 7-1 Esquema FTIR

L'espectrofotòmetre usat en aquest treball és també del tipus transformada de Fourier (Figura 7.2).



Figura 7-2. Espectrofotòmetre FT/IR-4100 //ATR ESPECAC de la marca Jasco



## 7.4 Absorció al UV-visible

L'espectroscòpia al UV-visible es basa, de la mateixa manera que el IR, en l'absorció d'energia a determinades longituds d'ona, en aquest cas d'entre 190 i 780 nm (zona ultravioleta-visible). Els electrons dels orbitals més exteriors passen d'un estat base a un estat excitat i en aquest procés absorbeixen radiació en diferents longituds d'ona en funció dels diferents tipus d'enllaç present en la mostra. Els electrons poden presentar molts nivells energètics depenent del seu entorn, però en l'espectre UV-VIS normalment sols s'aprecien 2 o 3 grans bandes ja que aquest gran nombre de subnivells queden solapats i representats com un sol nivell energètic

Les parts bàsiques d'un espectrofotòmetre són: la font de llum, suport per a la mostra, un monocromador per a filtrar la radiació i obtenir una sola longitud d'ona, i un detector. A més, els espectrofotòmetres poden ser de feix únic o doble. En el de feix únic aquest passa a través de la mostra, mentre que els espectrofotòmetres de feix doble permeten mesurar alhora un feix que passa per a la mostra i un feix de referència. L'espectrofotòmetre utilitzat en aquest treball és del tipus de doble flux.

En aquest treball, aprofitant el fet de que l'ADN presenta una banda d'absorció amb una  $\lambda$  màxima prop de 260 nm s'ha emprat la tècnica d'absorció de UV-visible per a confirmar l'encapsulació d'ADN en nanocristalls d'HAp. Es parteix de la hipòtesis inicial de que l'ADN absorbit a la superfície serà detectat però el que ha quedat encapsulat no.

La metodologia seguida per a totes les mostres és a la següent: es resuspenen 0.5 mg de cristalls en 1 cm<sup>3</sup> d'aigua desionitzada i s'homogeneïtza la suspensió amb l'ajuda d'una micropipeta. Es procedeix a llegir l'espectre d'absorció en el rang 220-320 nm, i a continuació en la mateixa cubeta s'afegeixen 100 mm<sup>3</sup> d'una dissolució HCl 0,1 M i NaCl 0,005 M que serveix per a destruir els cristalls (i alliberar l'ADN). Finalment es torna a recollir l'espectre d'absorció. Aquest procediment s'ha realitzat amb dos alíquotes de cada mostra de cristalls, una sotmesa a tractament enzimàtic de rentat superficial i l'altre no.

## 7.5 Espectroscòpia de fotoelectrons emesos per raigs X (XPS)

La tècnica XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) permet analitzar la composició química de la superfície d'una mostra. Es basa en la irradiació del material amb raigs X i en l'anàlisi de l'energia cinètica dels electrons que s'escapen de la part més superficial de la mostra o de regions més profundes en funció de com es realitzi el bombardeig. Per a realitzar aquest estudi es requereixen unes condicions de buit molt elevades ja que en cas contrari la velocitat d'adsorció de contaminants sobre la mostra seria massa elevada.

Un espectre típic d'XPS representa el nombre d'electrons detectat vs. l'energia d'enllaç. Cada element produeix una sèrie de pics en uns valors d'energia d'enllaç característics que permeten diferenciar-los. Aquests pics corresponen als diferents electrons (configuració electrònica): 1s, 2s, 2p, etc. El nombre d'electrons detectat en cada pic es pot relacionar amb el percentatge en massa de l'element en la mostra. És a dir, que l'XPS permet realitzar un anàlisi tan quantitatiu com qualitatiu.

En aquest treball s'ha examinat una de les mostres de nanotubs d'HAp carregades amb ADN, la superfície de la qual s'ha netejat amb enzim nucleasa, i una mostra de nanotubs sense càrrega a mode de blanc. La lectura de les mostres s'ha realitzat en el CRnE (centre de Recerca en Nanotecnologia) per personal especialitzat, i per tant es consideren un servei extern.

## 7.6 Electroforesis

L'electroforesi és una tècnica que permet separar les molècules segons la seva mobilitat a l'interior d'un camp elèctric. Aquest camp elèctric generarà una força sobre la molècula que la accelerarà fins a igualar la força de fricció, moment a partir del qual la molècula es desplaçarà a velocitat constant. Així doncs, la velocitat de cada molècula depèn de la seva densitat de càrrega i mida. En el cas dels àcids nucleics, aquests migren del pol negatiu al positiu en un camp elèctric a causa de les cargues negatives presents en l'esquelet de fosfats de l'ADN. La velocitat de migració és inversament proporcional a la mida molecular en el cas de l'ADN de doble hèlix i depèn de l'estructura terciària en el cas de fragments de cadena simple a causa dels plegaments que tendeixen a produir-se.

En aquest treball la tècnica d'electroforesi en gel d'agarosa s'ha utilitzat per a detectar l'ADN de forma tan sols qualitativa, amb l'objectiu d'obtenir més evidències de l'encapsulació.

El procediment seguit per a preparar el gel és el següent: es mesclen 1 g d'agarosa i 100 cm<sup>3</sup> de dissolució TBE en un erlenmeyer, s'escalfa la mescla durant 2 minuts en un microones i s'agita fins a dissoldre completament l'agarosa. A continuació s'afegeixen 5 mm<sup>3</sup> de bromur d'etidi, que s'intercala entre les bases nitrogenades de l'ADN i emet fluorescència al ser exposat a radiacions ultraviolades, fet que permet emprar-lo com a detector. S'aboca la mescla resultant en una cubeta prèviament segellada amb cinta adhesiva, i en la que també s'ha col·locat una pinta que servirà per a formar els pous on s'introduiran les mostres. Passats 30 minuts la mescla es solidifica i el gel ja està a punt per córrer l'electroforesi.

És important tenir en compte que el bromur d'etidi és una substància carcinògena i per tant s'han de extreure les precaucions durant la seva manipulació; s'ha de evitar tant la inhalació de vapors com el contacte directe amb la pell.

Per a carregar el gel es segueix el següent procediment: es pesen aproximadament 5 mg de cristalls i es resuspenen en 100 mm<sup>3</sup> d'aigua desionitzada. Aquest volum es divideix en 4 al·lòtots diferents: la primera es carregarà sense cap més tractament, en la segona s'hi afegeix EDTA per destruir les partícules, a la tercera se li aplica un tractament amb nucleasa per a netejar la superfície cristal·lina i la quarta se li aplica el mateix tractament amb enzims i posteriorment és destruïda també amb EDTA.

A continuació s'afegeix a cada alíquota 2 mm<sup>3</sup> del tampó de càrrega, una dissolució constituïda principalment per glicerol, la funció del qual és augmentar la densitat, i blau de bromofenol, que actua com a marcador. Seguidament les mostres són carregades en els pous del gel amb l'ajuda d'una micropipeta, a més dels cristalls amb ADN també es carreguen en el gel cristalls sense ADN (a mode de blanc), un marcador de pes molecular i una mostra del propi ADN de salmó.

Finalment es connecten els dos pols al gel (negatiu adjacent als pous i positiu en l'extrem contrari ja que la càrrega de l'ADN és negativa) i es subministra corrent continua a 90 V durant aproximadament 30 minuts.

## 8. Creixement de cristalls d'HAp

### 8.1 Cristalls obtinguts amb el mètode de precipitació química a baixes temperatures.

En aquest apartat s'inclouen les imatges obtingudes en TEM/SEM de diferents preparacions seguint el mètode de l'apartat 6.1.1. S'agrupen segons el pH de síntesi i es presenten en ordre decreixen de pH des de 11.5 fins a 8.

#### l) Mostres preparades a pH = 11.5

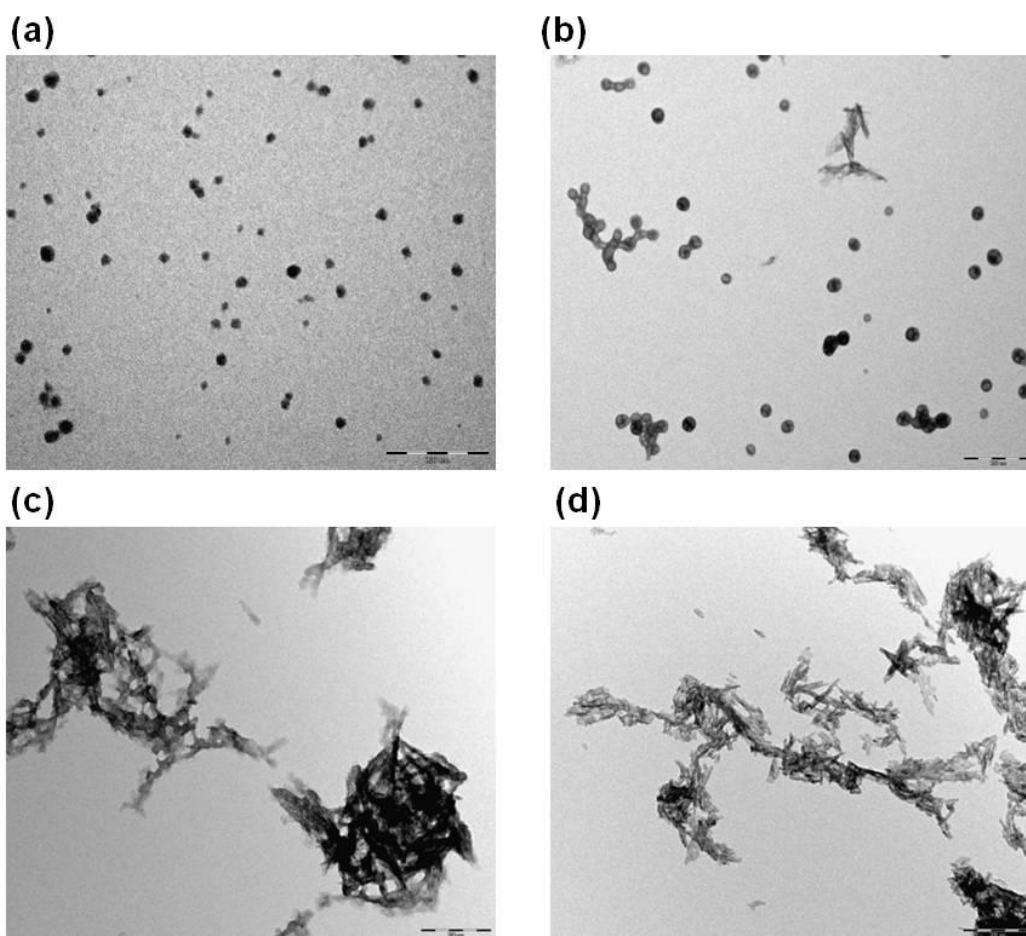


Figura 8-1. Imatge TEM de mostres preparades a pH 11.5 ; Concentració reactius = 0,3 M; T = 40°C ; addició de cop ; agitació 400 rpm (a) i (b) en medi aquós i (c) i (d) en etanol (escala 200 nm)

En les imatges del TEM de la mostra preparada en medi aquós (Figura 8-1 (a) i (b)) es poden observar cristalls de morfologia esfèrica o quasi-esfèrica de mida molt reduïda. Aquestes esferes no constitueixen el total de la població sino que conviuen amb alguns agregats estel·losos (Figura 8-1 b) però en general s'ha pogut comprovar que els experiments realitzats a pH més alt han produït els cristalls més isotròpics (tal i com es reporta en la bibliografia consultada). Per contra, els experiments realitzats en condicions similars però en etanol en comptes de medi aquós han resultat en formes molt poc definides constituïdes per agregats filamentosos, amb una certa tendència a formar estelles però poc definides. En aquest cas doncs, no ha sigut possible reproduir els resultats de la literatura consultada <sup>[48]</sup>.

## II) Mostres preparades a pH 10

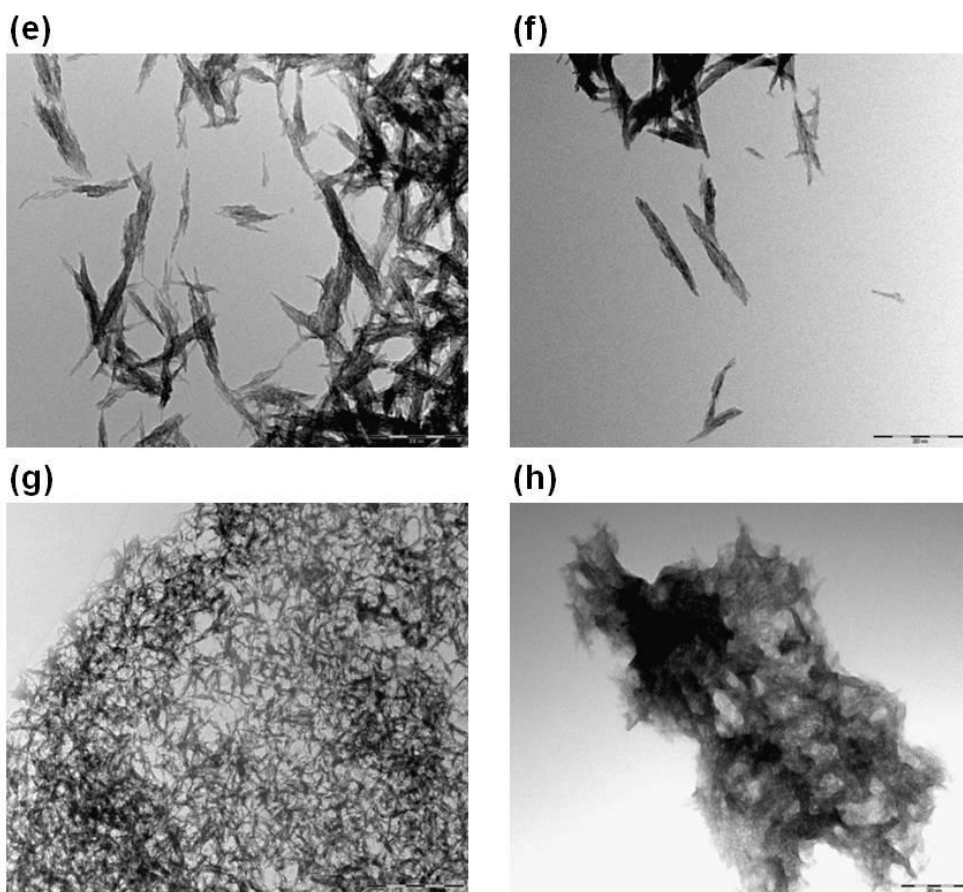
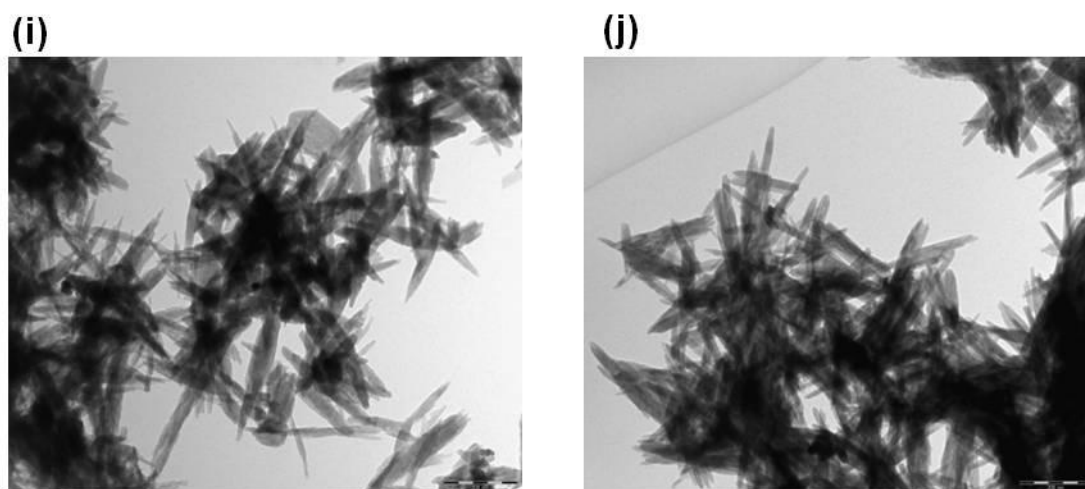


Figura 8-2. Imatge TEM de mostres preparades a pH 10, Concentració reactius = 0,3 M, T = 40°C i medi aquós.

(e) Amb trietanolamina i 400 rpm, (f) Amb monoetanolamina i 400 rpm, (g) sense dispersant i 400 rpm, (h) amb monoetanolamina i 1100 rpm (totes les escales 200 nm excepte (c) escala 500 nm)

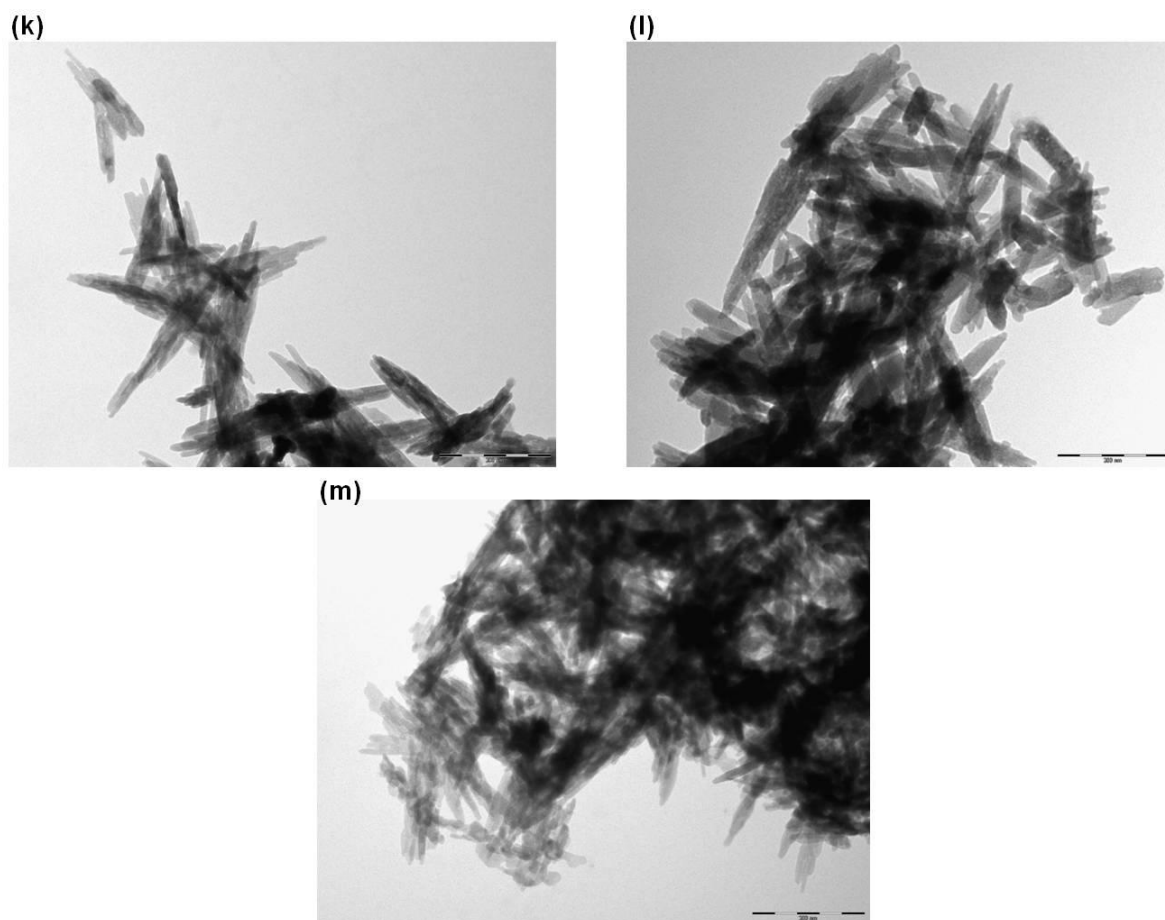


Les mostres de la Figura 8-2 (totes preparades a pH 10 i 40°C) han resultat tenir una morfologia poc definida tendint a agregats filamentosos i estel·losos, l'objectiu d'aquests experiments era obtenir nanoesferes però en cap cas s'ha assolit aquesta morfologia. La mostra (d) presenta una morfologia encara més indefinida i està constituïda per agregats on sembla impossible diferenciar-hi nanocristalls, això possiblement és degut a la alta velocitat d'agitació (1100 rpm). S'han fet proves també amb diversos agents dispersants (tri- i mono- etanolamina), però no s'han pogut observar millores significatives en l'aglomeració dels nanocristalls en cap dels casos.



**Figura 8-3. Imatge TEM de mostres preparades a pH 10, T = 60°C, concentració reactius = 0,3 M, 400 rpm, (e) amb monoetanolamina (f) sense dispersant (escala 200 nm)**

Les mostres de la Figura 8-3 han estat preparades a 60°C. Es pot observar que al augmentar la temperatura els cristalls passen a estar més definits, assolint una morfologia que varia entre l'estel·losa i la tubular. No obstant, la dispersió tampoc s'ha pogut millorar mitjançant l'ús de monoetanolamina. Tant en les mostres preparades a 40°C com les de 60°C els cristalls resultats són notablement més grans que en el cas de les nanoesferes (pH 11,5). Sembla ser doncs, que al disminuir la basicitat del medi augmenta la mida dels cristalls.

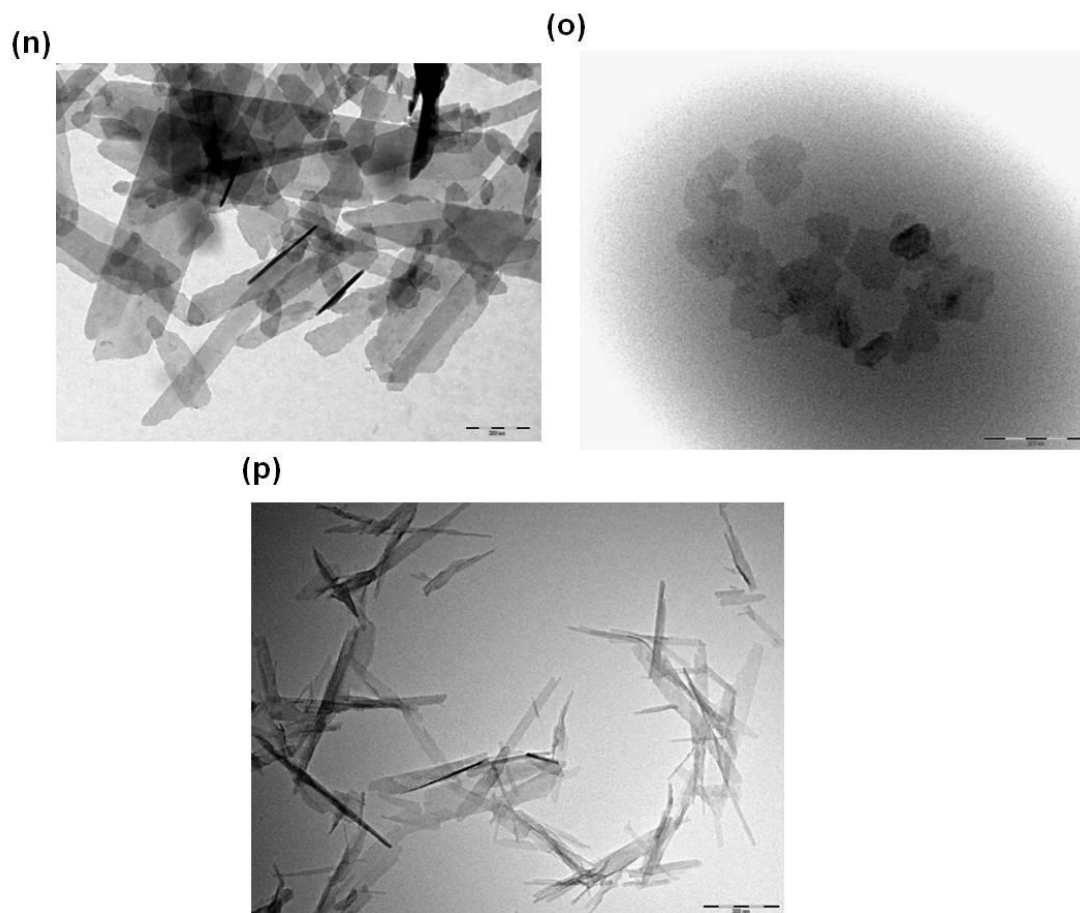


**Figura 8-4. Imatge TEM de mostres preparades a pH 10, T = 80°C, concentració reactius = 0,3 M, 400 rpm, medi aquós (a) Amb trietanolamina (b) Amb monoetanolamina (c) Sense dispersant (escala 200 nm)**

Aquestes mostres presenten una morfologia de nanotub (Figura 8-4). En el cas de (k) els tubs estan molt més definits que en el cas (l). Això podria ser degut a que la monoetanolamina és més bàsica que la trietanolamina ( $pK_b$  (TEA) = 6.24 ;  $pK_b$  (MEA) = 4.5) i per tant afecta el pH del medi de reacció (la seva addició s'ha realitzat en la solució de  $Ca^{2+}$  després de regular el pH). En el cas de la mostra (m) la morfologia també és tubular i els tubs estan força definits, però l'aglomeració és molt important i en conseqüència es fa més difícil diferenciar-los.



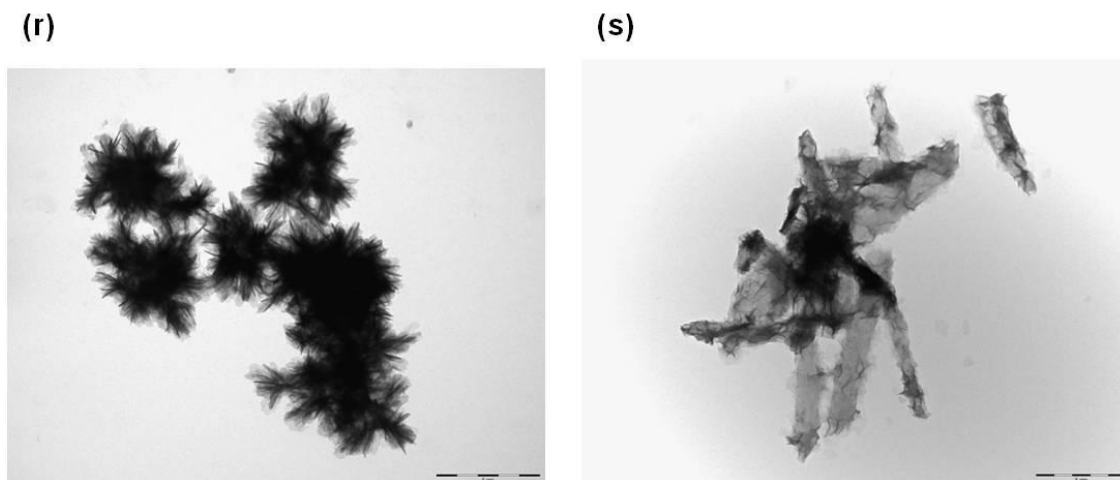
### III) Mostres preparades a pH 8



**Figura 8-5. Imatge TEM de mostres preparades a pH 8, medi aquós, sense dispersants, 400 rpm, (n) 40°C, (o) 60°C, (p) 80°C (escala 200 nm)**

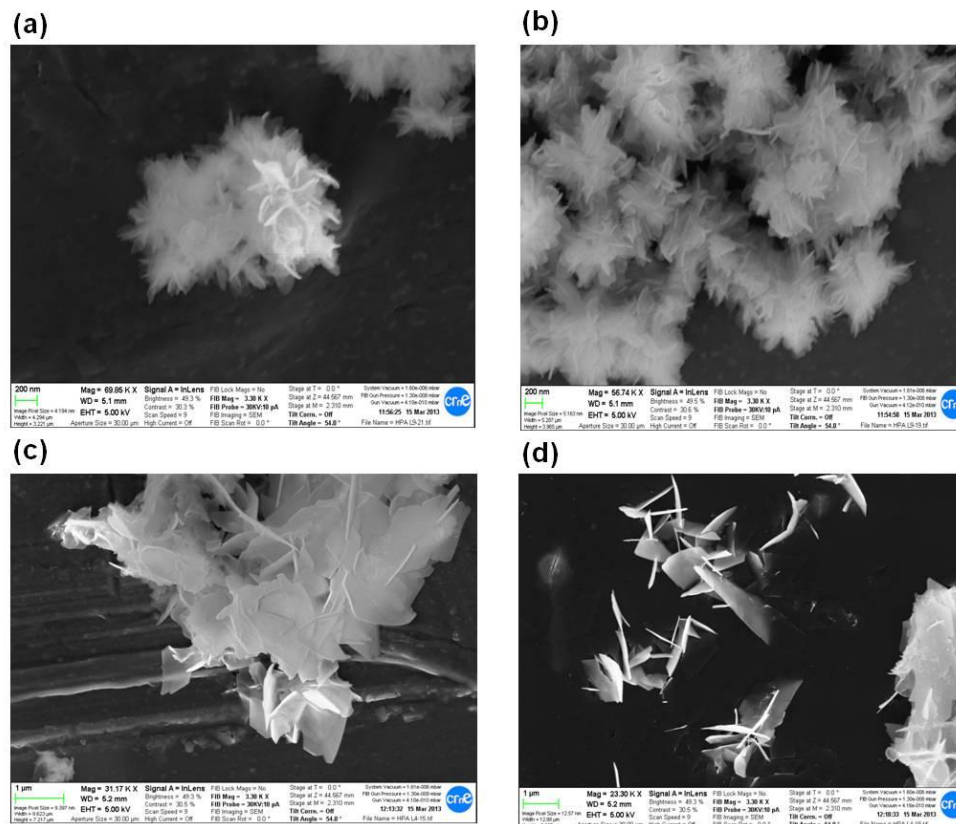
Les imatges de la Figura 8-5 corresponen a les mostres preparades a pH més àcid. En els tres casos es tracta de cristalls laminars extremadament prims. No s'ha mesurat l'amplada però s'estima que pot ser de l'ordre de pocs nanòmetres. Les partícules de la mostra preparada a més temperatura (n) són a més, molt allargats, és a dir, més anisotròpics que els preparats a menys temperatures.

Els nanocristalls poden tenir tendència a agregar-se en forma de súper-estructures, que al seu torn poden ser més o menys regulars. En la Figura 8-6 es poden observar les imatges TEM de dues de les estructures jerarquitzades obtingudes.



**Figura 8-6. Imatge TEM de mostres preparades a pH 8, 60 °C, medi aquós sense dispersants, (r) concentració reactius = 0,003M i (s) Concentració reactius = 0,3 M (escala 1 µm)**

En ambdós casos, la morfologia dels nanocristalls és laminar, tot i que aquests s'han agrupat de forma diferent. En la mostra de la Figura 8-6 (s) les nanolàmines s'han adherit formant una espècie de braços, mentre que en la Figura 8-6 (r) s'han agregat formant "flors". Aquestes mateixes mostres també s'han observat amb el SEM, per a obtenir una imatge més clara (Figura 8-7).



**Figura 8-7. Imatges SEM de mostres preparades a pH 8, 60 °C, medi aquós sense dispersants; (a) i (b) concentració reactius = 0,003 M , (c) i (d) Concentració reactius = 0,3 M (a i b escala 200 nm, c i d escala 1 μm)**

Analitzant els resultats de les experiències realitzades s'ha observat que les variables que tenen un impacte més gran sobre la morfologia són el pH i la temperatura. A continuació es mostra a mode de resum les diferents morfologies a les que els cristalls tendeixen en funció de les dos variables mencionades en medi aquós (Taula 8-1).

**Taula 8-1. Morfologia en medi aquós en funció de pH i T**

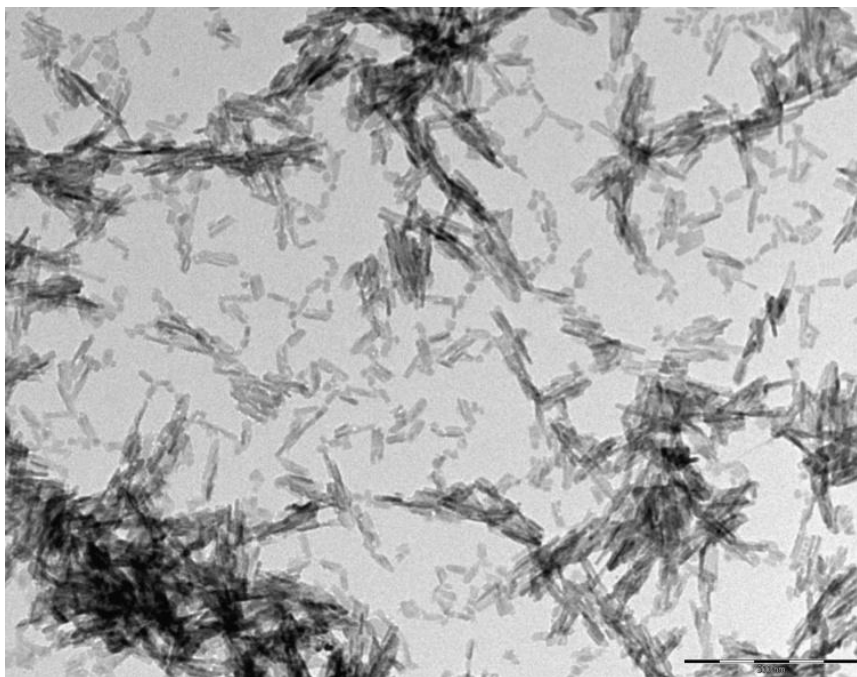
	pH 8	pH 10	pH 11.5
40°C	Làmines	Agregats estel·losos (poc definits)	Esferes (+algunes estelles)
60°C	Làmines	Estelles definides	No realitzat
80°C	Làmines allargades	Nanotubs	No realitzat

La morfologia tendeix a ser més isotròpica a pH més elevats (s'obtenen cristalls laminars a pH's relativament baixos i esferoïdals a pH's elevats), mentre que a temperatures elevades augmenta l'anisotropia. Aquesta mateixa tendència està descrita en la bibliografia consultada [1,8].

També s'ha avaluat l'eficàcia de dos agents dispersants emprats en la bibliografia [8] amb l'objectiu d'evitar l'aglomeració dels nanocristalls: trietanolamina i monoetanolamina. En cap dels casos s'han observat millores significatives. Finalment, s'ha observat que al treballar amb una velocitat d'agitació excessiva s'obtenen agregats filamentosos on ja no apareixen cristalls individualitzats.

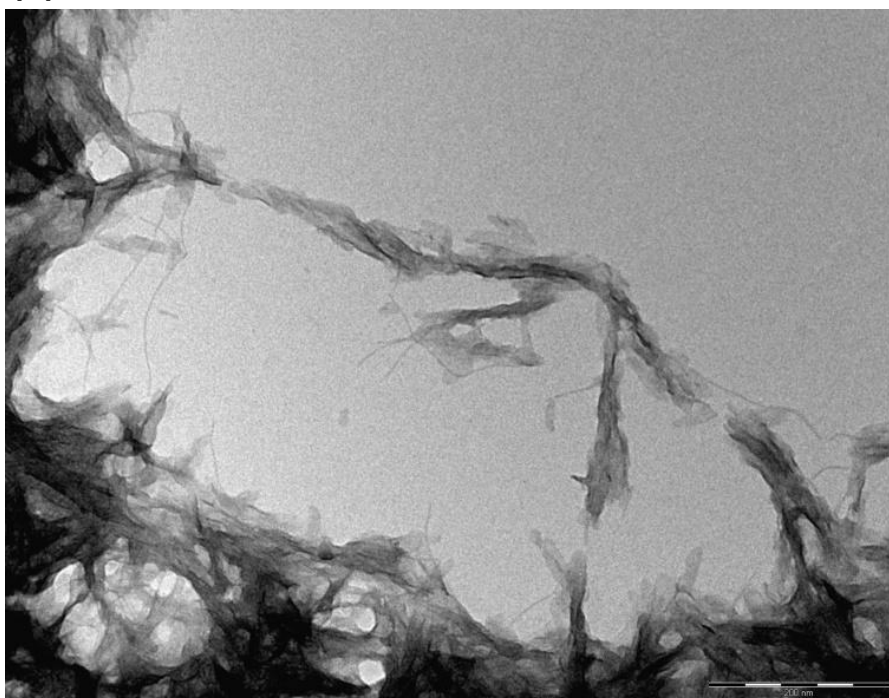
## **8.2 Cristalls obtinguts amb tractament hidrotèrmic en reactor autoclau**

La Figura 8-8 correspon a una mostra de cristalls preparada en el reactor autoclau a una temperatura de 180°C, en presència de surfactant CTAB i de citrat de sodi (apartat 6.1.2). Els cristalls obtinguts són nanotubs molt definits, regulars, i amb una dispersió relativament bona, fet que podria ser degut a la presència de ions citrat, que com s'ha comentat anteriorment són capaços d'interaccionar amb el calci formant un complex que perd la seva estabilitat al augmentar la temperatura.

**(a)**

**Figura 8-8. Imatge TEM de mostra preparada en reactor autoclau a 180°C, pH (solució  $\text{Ca}^{2+}$ )= 4,5, medi aquós, en presència de citrat de sodi i CTAB (escala 200 nm).**

Per a comprovar quin es l'efecte del tractament hidrotèrmic (P i T elevades) i si és possible obtenir resultats semblants en condicions més suaus que permetessin evitar l'ús de l'autoclau (i per tant simplificar el procés evitant el risc associat a l'ús d'un reactor pressuritzat), s'ha realitzat una preparació mantenint totes les condicions constants excepte la temperatura que s'ha fixat en 40°C (Figura 8-9).

**(b)**

**Figura 8-9. Imatge TEM de mostra preparada a 40°C, pH (solució  $\text{Ca}^{2+}$ ) = 4,5, medi aquós, en presència de citrat de sodi i CTAB (escala 200 nm)**

Els resultats obtinguts mostren que el tractament hidrotèrmic té un efecte molt important sobre la morfologia dels cristalls. La mostra que no ha passat pel reactor autoclau (Figura 8-9) està constituïda per agregats filamentosos en els que no és possible diferenciar cristalls individuals.

No s'ha realitzat una preparació amb tractament hidrotèrmic i sense citrat de sodi, i en conseqüència no s'ha pogut determinar si és possible assolir la morfologia de nanotubs molt definits (i dispersos) gracies al tractament hidrotèrmic o a l'ús combinat d'aquest tractament i del citrat de sodi. Degut al gran nombre de variables implicades, seria necessari realitzar un estudi molt més exhaustiu i dissenyar un seguit d'experiments del tipus factorial per a determinar el seu impacte i el de les seves interaccions. Com s'ha mencionat en l'abast del projecte, no es pretén investigar de forma exhaustiva l'efecte de totes les variables implicades si no tan sols establir les condicions òptimes per a preparar cristalls amb morfologies definides i aglomeracions controlades.



### 8.3 Cristalls obtinguts en microemulsió

En la Figura 8-10 es poden observar fotografies obtingudes mitjançant el TEM d'una mostra preparada seguint el mètode de cristallització en microemulsió (apartat 6.1.3). Els cristalls obtinguts són molt irregulars i presenten una morfologia poc definida. S'han observat un gran nombre de formacions que semblen cristalls allargats agregats i distribuïts de forma radial, que podrien correspondre a grups de cristalls formats dintre de la mateixa micel·la durant el procés de nucleació i cristallització. A més, en la mostra també s'hi ha pogut observar algunes partícules esferoidals i altres partícules completament amorfes.

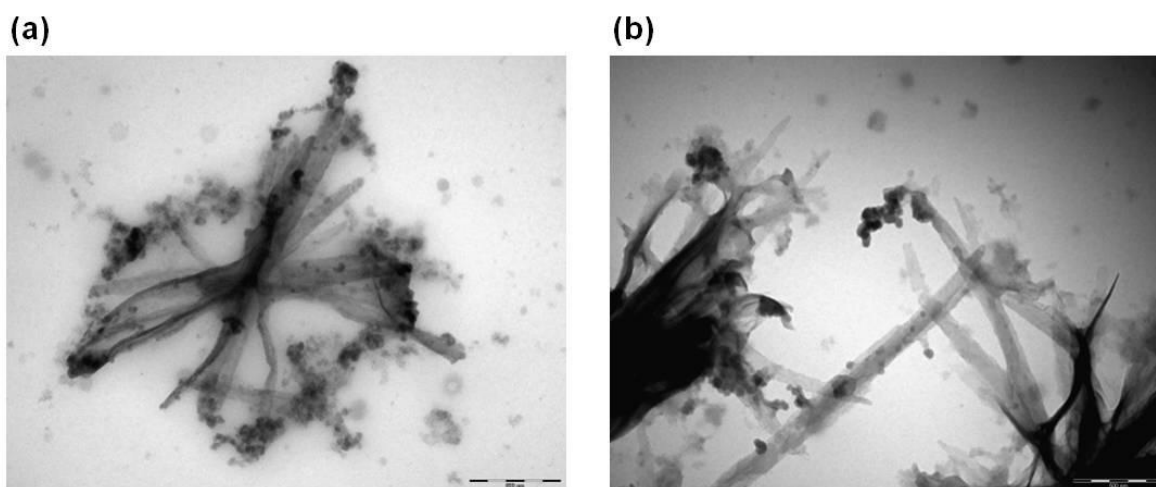


Figura 8-10. Imatge TEM de mostra de nanocristalls preparada en microemulsió (escala 500 nm)

L'heterogeneïtat dels cristalls sintetitzats seguint aquest mètode és molt gran, i per tant, no permet assolir un control eficient de la morfologia. A més, no tan sols s'ha observat una gran millora en la dispersió dels cristalls en comparació amb els altres dos mètodes emprats si no que l'aglomeració és fins i tot més pronunciada.

## 8.4 Estructura cristal·lina (XDR)

Com s'ha explicat en l'apartat 7.2. No ha sigut necessari emprar un procediment iteratiu de resolució habitual si no que ha estat suficient la comparació directe del gràfic *Intensitat vs angle 2θ* d'una de les mostres sintetitzades al laboratori (Figura 8-11) amb els pics característics reportats en la bibliografia (A.S.T.M. card No. 9-432).

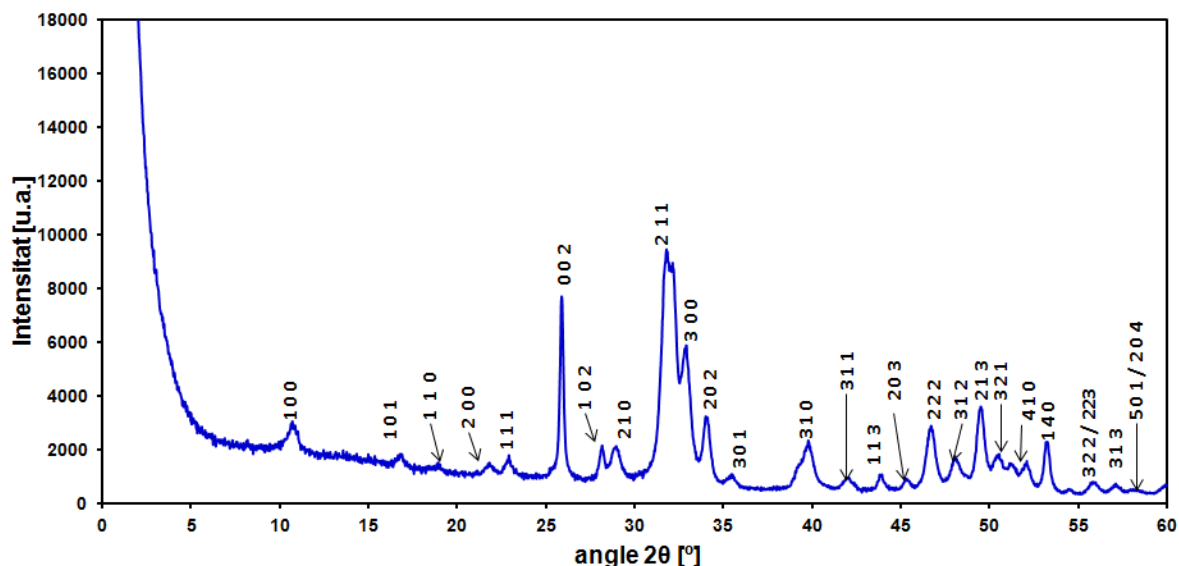


Figura 8-11. Diagrama XRD de la hidroxiapatita sintetitzada en el laboratori (mostra preprada a pH 10, T = 80°C, medi aquós, amb trietanolamina com a dispersant, 400 rpm).

El diagrama obtingut presenta els pics característics de la xarxa cristal·lina de l'HAp estequiomètrica (cel·la monoclinica amb grup espacial  $P2_1/b$ ), per tant, aquest estudi permet arribar a la conclusió de que els cristalls estudiats corresponent inequívocament a hidroxiapatita i no a altres sals de la família d'ortofosfats de calci.

També s'ha inclòs un espectre XDR extret de la literatura (Figura 8.12) on es poden observar aquesta mateixos pics.



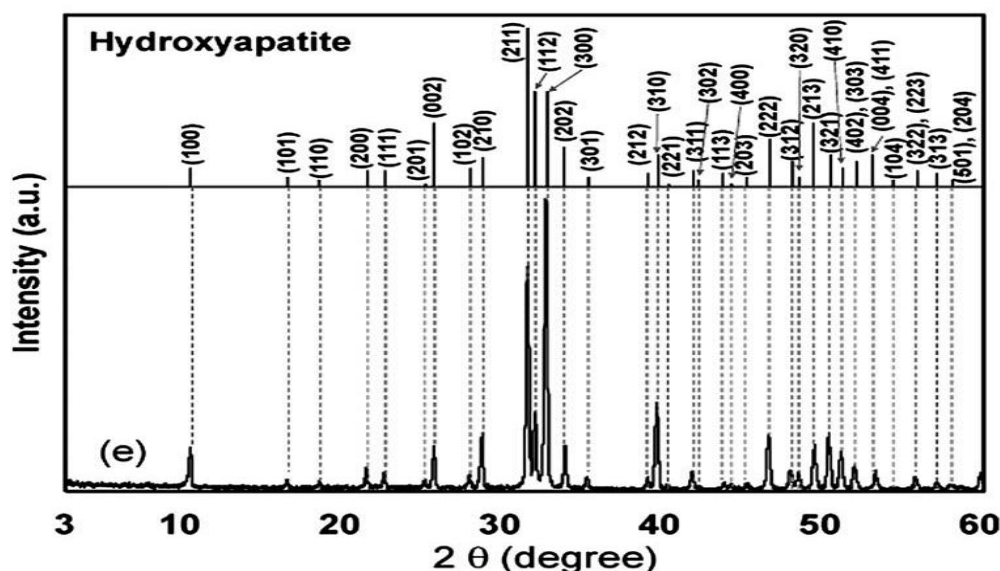


Figura 8.12 Diagrama XDR de HAp cristal·lina [52]

## 8.5 Selecció de morfologies i mètodes per a l'encapsulació

S'han avaluat tres mètodes diferents per a preparar nanopartícules de morfologia controlada sense presència d'ADN: precipitació a baixes temperatures, tractament hidrotèrmic en reactor autoclau i preparació en microemulsió.

Amb el primer mètode s'han obtingut diverses formes diferenciades i definides (tubs, estelles, esferes i làmines) en condicions relativament suaus. Mitjançant el reactor autoclau s'han obtingut tubs molt ben definits i amb una dispersió molt bona (poc aglomerats) i per últim, no ha sigut possible obtenir cristalls definits amb el mètode de microemulsió.

Es seleccionen els mètodes que han donat millors resultats (precipitació a baixes temperatures i tractament hidrotèrmic en reactor autoclau) per a realitzar l'encapsulació d'ADN d'esperma de salmó intentant a la vegada mantenir les morfologies obtingudes.

## 9. Nucleació i cristal·lització en presència d'ADN d'esperma de salmó.

### 9.1 Estudi de l'efecte de l'ADN sobre la morfologia

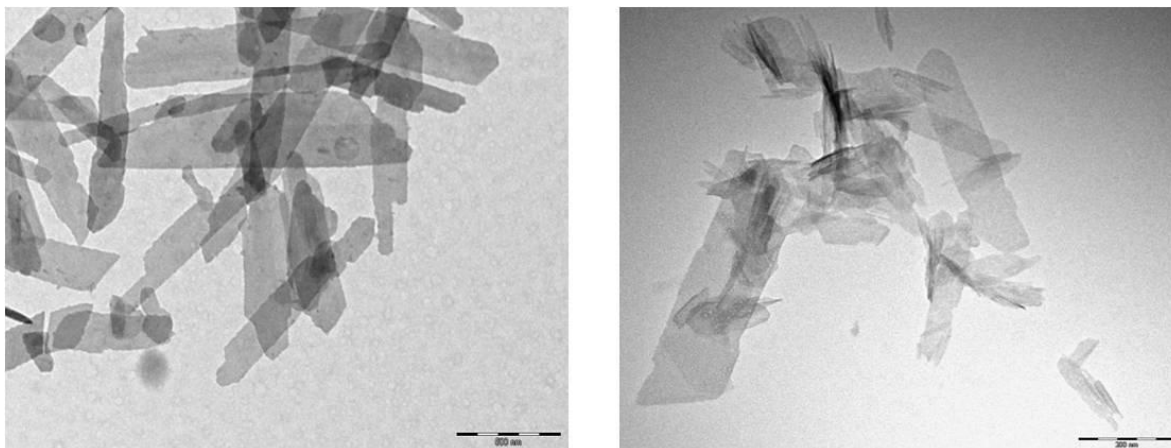
Un dels objectius d'aquest projecte era el de determinar si la presència d'ADN (actuant com a nucleant de la cristal·lització) podia tenir efectes significatius i apreciables sobre la morfologia dels cristalls preparats. De ser així, podria arribar a ser possible diferenciar els cristalls amb ADN encapsulat dels cristalls sense ADN simplement amb l'ajuda d'un microscopi electrònic.

Amb l'ajuda del TEM, s'ha comparat la morfologia final obtinguda de cristalls preparats amb i sense presència d'ADN (i mantenint la resta de condicions de reacció).

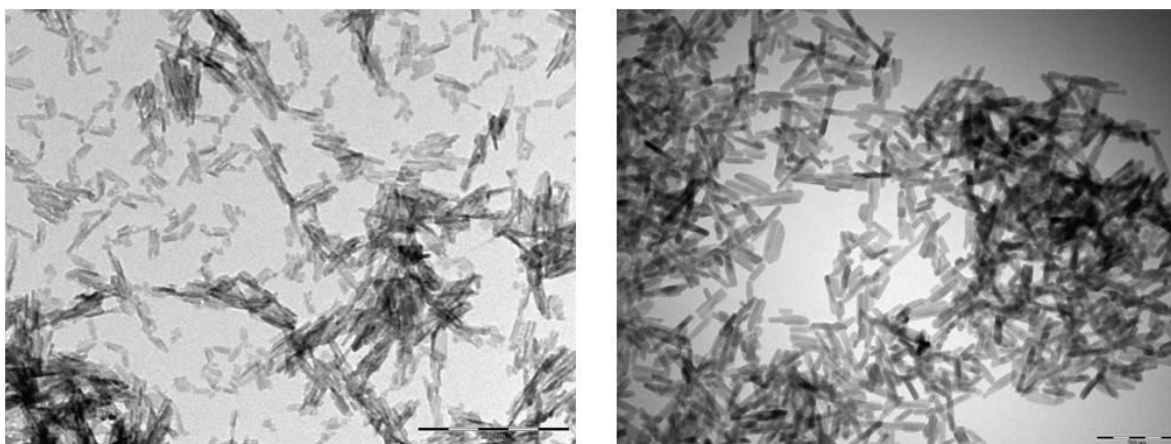
A continuació es presenten tres comparatives de cristalls preparats en idèntiques condicions amb ADN. Els cristalls Figura 9-1 i de la Figura 9-2 han estat preparats segons el mètode de precipitació a baixes temperatures i els de la Figura 9-3 amb el reactor autoclau a temperatures elevades.



Figura 9-1. Nanotubs preparats a pH 10 i 80°C en medi aquós (esquerra: preparació sense ADN, dreta: amb ADN).



**Figura 9-2. Nanolàmines prepades a 60°C i pH 8 (esquerra: preparació sense ADN, dreta: preparació amb ADN)**



**Figura 9-3. Nanotubs preparats en reactor autoclave amb presència de citrat de sodi (esquerra: preparació sense ADN, dreta: preparació amb ADN)**

Les imatges són només una fotografia molt petita d'unes poblacions de cristalls molt més grans, però s'ha intentat seleccionar-les de forma que fossin representatives de cada mostra. Les observacions del total del contingut de les mostres s'ha intentat realitzar de la forma més exhaustiva possible i no s'han pogut detectar diferències sistemàtiques entre els cristalls preparats amb i sense presència d'ADN.

Aquest estudi també ha sigut complicat a causa de la tendència a la formació d'agregats, la presència d'artefactes resultants de la preparació per el microscopi electrònic, possibles impureses i la variabilitat de morfologies dins d'una mateixa mostra degudes a variacions locals del pH durant la preparació associades a la incorporació de ions  $\text{OH}^-$  en les xarxes dels cristalls.

## 9.2 Validació de l'encapsulació

### 9.2.1 Estudi de l'encapsulació amb absorció al UV-visible

En la Figura 9-4 s'hi poden observar els resultats obtinguts per a una mostra de cristalls HAp-ADN preparats amb el mètode de precipitació a baixes temperatures (veure apartat 6.2.1).

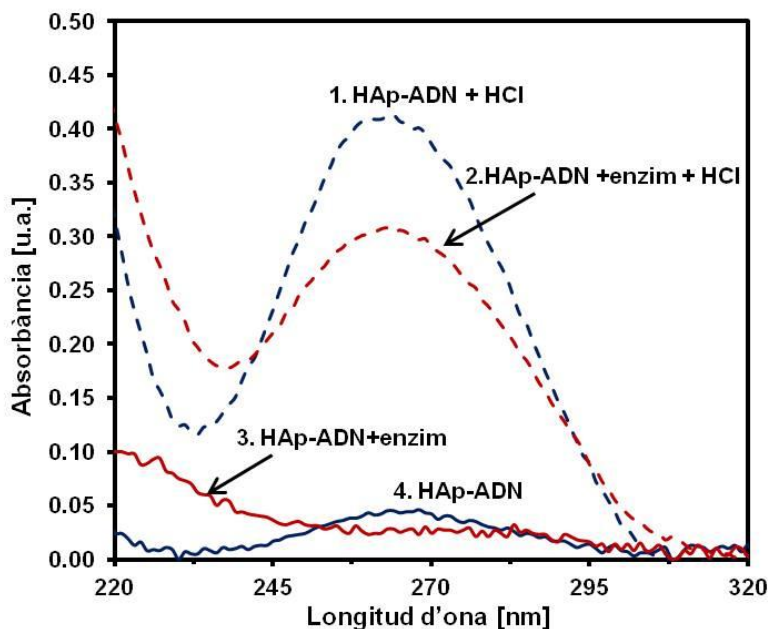


Figura 9-4 Espectre UV-visible de cristalls HAp-ADN preparats a baixes temperatures: corba 1 HAp-ADN no rentats amb enzims i destruïts amb àcid, corba 2 HAp-ADN rentats amb enzims i destruïts amb àcid, corba 3 HAp-ADN rentats amb enzims (no destruïts), corba 4 HAp-ADN no rentats amb enzims ni destruïts

La mostra de cristalls no sotmesa al tractament enzimàtic (corba 4) presenta un petit pic d'absorció degut a l'ADN superficial. En destruir aquests cristalls amb àcid clorhídric, l'ADN encapsulat queda alliberat i això es tradueix en un gran augment del pic (corba 1). En contraposició, l'alíquota tractada amb enzims no presenta cap pic en els 260 nm abans de l'addició de la dissolució àcida (corba 3). En afegir la dissolució i destruir els cristalls apareix un gran pic degut a l'alliberació de l'ADN encapsulat (corba 2).

Els resultats d'aquest experiment han permès confirmar que l'encapsulació de cadenes d'ADN a l'interior de nanocristalls d'hidroxiapatita s'ha dut a terme amb èxit. A més, també demostra que l'ADN incorporat a l'interior dels cristalls presenta pic d'absorbància. Finalment, aquest experiment també ha servit per a demostrar que netejar els cristalls amb solucions aigua-etanol i amb la dissolució de fosfats no és suficient per a eliminar tot l'ADN superficial i que és necessari emprar els enzims nucleasa.

Un cop confirmada l'encapsulació, s'ha realitzat la quantificació de l'ADN adsorbit i de l'encapsulat. Aquest càlcul s'ha basat en dues consideracions importants que cal tenir en compte:

1. Es pot relacionar l'absorbància dels espectres UV-visible amb la quantitat d'ADN present mitjançant la proporció: **1 unitat absorbància – 50 µg ADN/cm<sup>3</sup>** (recta de calibratge universalment acceptada per a l'ADN de doble hèlix).
2. La quantitat d'enzim afegit a les mostres (5 mm<sup>3</sup>, >2000 kunitz/cm<sup>3</sup>) i el temps de digestió (30 minuts a 37°C) han estat suficients per eliminar tot l'ADN superficial.

En base a la mesura d'absorbància de les mostres estudiades abans i després de la digestió es quantifica l'ADN abans i després del tractament i es calcula la proporció adsorbida i encapsulada mitjançant un simple balanç de masses (Eq. 9-1).

$$\begin{cases} m_{\text{ADN abans del tractament}} = m_{\text{ADN encapsulat}} + m_{\text{ADN adsorbit}} \\ m_{\text{ADN després del tractament}} = m_{\text{ADN encapsulat}} \end{cases} \quad (\text{Eq. 9-1})$$

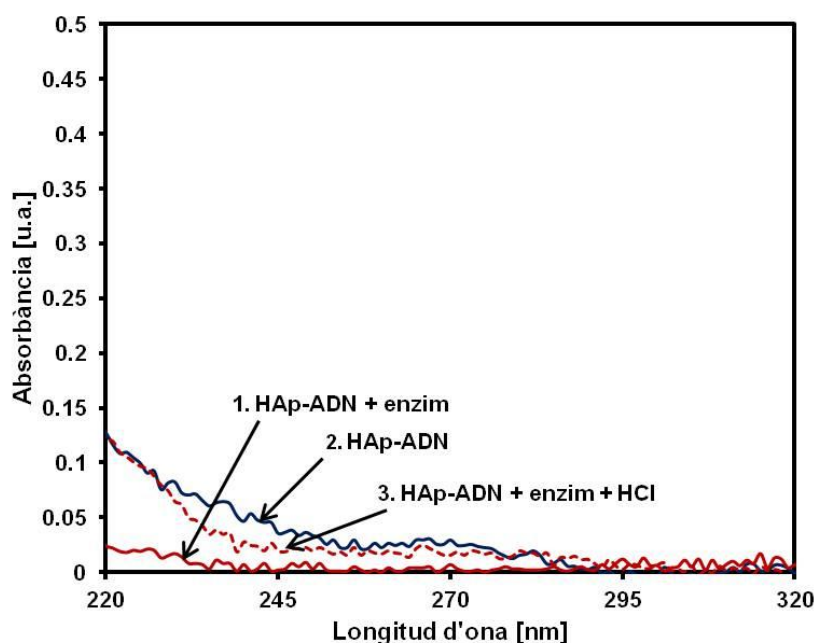
Aquest càlcul s'ha dut a terme amb tres mostres diferents, els resultats estan recollits en la Taula 9-1.

**Taula 9-1 Quantificació de l'ADN en els nanocristalls**

<b>Mostra</b>	<b>m<sub>adn inicial</sub> / m<sub>Hap</sub> [µg ADN/mg Hap]</b>	<b>m<sub>adsorbit</sub> ADN / m<sub>Hap</sub> [µg ADN/mg Hap]</b>	<b>m<sub>ADN-encapsulat</sub> / m<sub>Hap</sub> [µg ADN/mg Hap]</b>
<b>A</b>	303	22.3	7.4
<b>B</b>	127	10.96	32.44
<b>C</b>	75.6	7.97	14.68

Els valors de la primera columna corresponen a la quantitat d'ADN introduïda en el medi de reacció per mg d'HAp. La segona i la tercera corresponen al ADN adsorbit i encapsulat respectivament. S'ha de tenir en compte que la suma d'ADN adsorbit i encapsulat no és igual al inicial, ja que al preparar els cristalls part d'aquest s'ha quedat en el medi de reacció.

La caracterització amb UV-visible s'ha realitzat també amb nanocristalls preparats a altes temperatures en el reactor autoclau i en presència d'ADN. Els resultats estan recollits en la Figura 9-5.



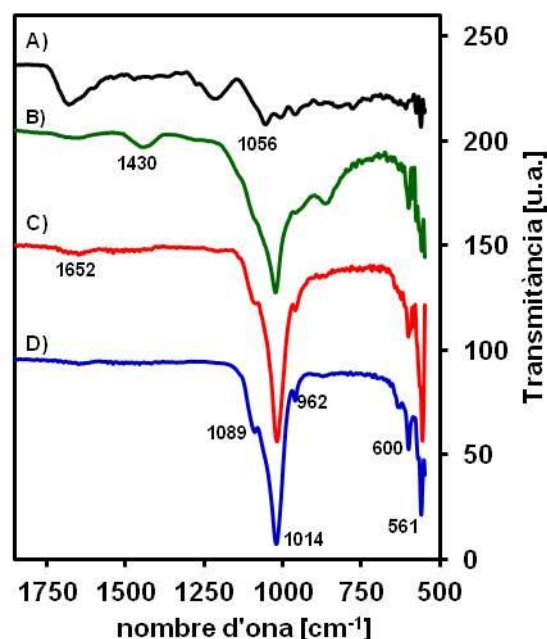
**Figura 9-5** Espectre UV-visible de cristalls HAp-ADN preparats en autoclave: corba 1 HAp-ADN rentats amb enzims, corba 2 HAp-ADN no rentats amb enzims, corba 3 HAp-ADN rentats amb enzims i destruïts amb àcid.

Els resultats obtinguts mostren que en aquest cas no s'ha pogut encapsular l'ADN, i que de fet ni tan sols ha quedat ADN adsorbit a la superfície cristal·lina. Aquest fet probablement és degut a que l'ADN s'ha degradat a causa de les agressives condicions del medi de reacció (pressió i temperatura). D'aquest experiment se'n extreu la conclusió de que la tècnica de cristal·lització en reactor autoclau no és adequada per obtenir cristalls HAp-ADN.



### 9.2.2 Estudi de l'encapsulació amb FTIR

En aquest treball, la tècnica de FTIR ha sigut una de les que s'ha intentat emprar per tal de determinar si l'encapsulació s'ha realitzat amb èxit.



**Figura 9-6 Espectre IR de cristalls HAp-ADN: A) ADN pur, B) HAp-ADN no sotmeses al tractament enzimàtic, C) HAp-ADN sotmeses al tractament enzimàtic, D) HAp sense ADN**

En la corba D de la Figura 9-6 es poden observar els pics característics de la hidroxiapatita deguda als ions  $\text{PO}_4^{3-}$  en 1089, 1014, 962, 600 i 561  $\text{cm}^{-1}$ . En la corba B es pot observar una gran banda entre 1100 i 800  $\text{cm}^{-1}$ , probablement deguda a la superposició de les senyals de l'ADN amb la dels pics corresponents a la hidroxiapatita. Aquesta banda no apareix en el cas de la mostra sotmesa al tractament de neteja superficial amb enzims (corba C), en aquest cas tan sols es pot observar una lleugera depressió a la zona de les amines (1652) que per si sola no seria suficient per a confirmar l'encapsulació (degut a la dificultat de diferenciar-la de contaminacions i senyal de fons). No obstant, aquesta mateixa mostra ha estat estudiada amb UV i s'ha confirmat l'encapsulació (Figura 9-4).

D'aquest estudi se'n dedueix que l'ADN adsorbit a la superfície és fàcilment detectable mitjançant FTIR però per contra l'encapsulat no. Aquest resultat sembla coherent amb el que s'ha observat al recollir els espectres UV dels cristalls HAp-ADN (l'ADN encapsulat no dona cap pic d'absorbància i aquest només es detecta després de destruir els cristalls).

Finalment, en la corba B també apareix una senyal a  $1430\text{ cm}^{-1}$  que és deguda a ions carbonat incorporats en la xarxa cristal·lina, probablement degut a la absorció i hidròlisi de  $\text{CO}_2$  atmosfèric durant el procés de preparació.

### 9.2.3 Estudi de l'encapsulació amb XPS

Dos mostres de cristalls han estat estudiades mitjançant aquesta tècnica analítica: una mostra de nanotubs sense ADN a mode de blanc, i una segona mostra també de nanotubs preparada en presència d'ADN d'esperma de salmó (i posteriorment sotmesa al tractament amb enzims nucleasa).

La diferència clau entre els espectres de les dos mostres (Figura 9-7) és la presència del pic corresponent al nitrogen (aproximadament a 400 eV) que indica la presència de bases nitrogenades i en conseqüència d'ADN. En condicions de buit tan severes el nitrogen atmosfèric no provoca interferències tal i com demostra l'espectre del blanc, i per tant la presència d'aquest pic es pot associar inequívocament al ADN. Tenint en compte que la mostra de cristalls amb ADN ha sigut sotmesa al tractament de neteja superficial amb enzims es dedueix que aquesta senyal correspon a cadenes d'ADN encapsulades a l'interior de les nanopartícules.

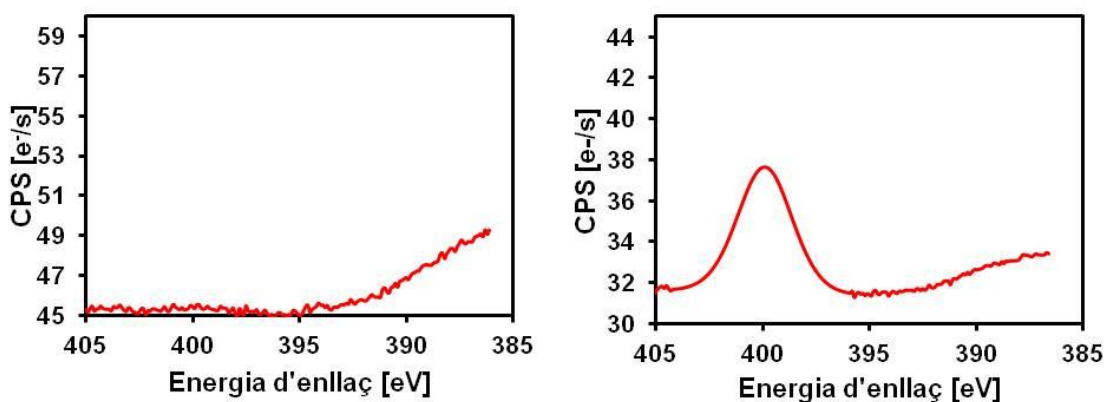


Figura 9-7. Espectres XPS en la banda del nitrogen (esquerra HAp, dreta HAp-ADN)



Teòricament també es podria considerar la presència de carboni com a un indicador de l'encapsulació de l'ADN, ja que la hidroxiapatita pura i estequiomètrica no conté aquest element. No obstant, cal recordar que l'HAp té una tendència molt pronunciada a incorporar ions carbonat (provinents del  $\text{CO}_2$  atmosfèric) a la seva xarxa cristal·lina. La Figura 9-8 correspon als espectres XPS en la banda del carboni de les dos mostres estudiades. En ambdós espectres s'observa el pic del carboni (entre 285 i 290 nm), fet que s'explica per la presència d'aquests ions carbonat.

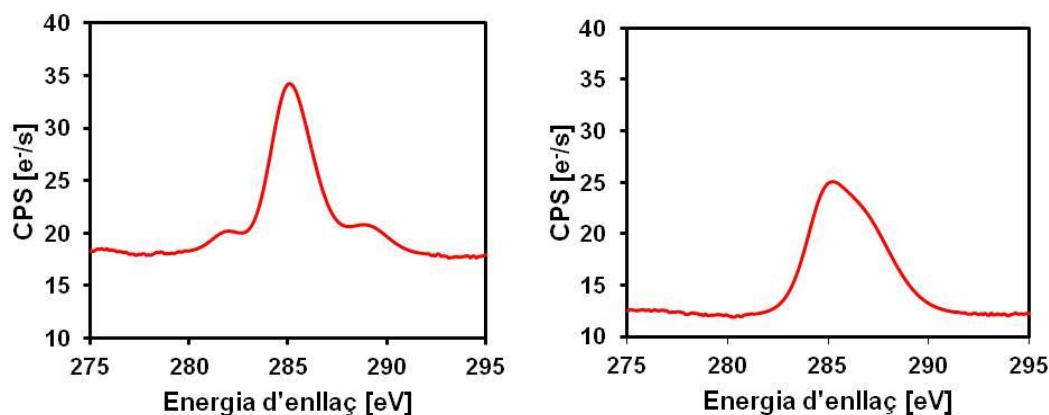


Figura 9-8. Espectres XPS en la banda del carboni (esquerra HAp, dreta HAp-ADN)

A més, en ambdues mostres també s'han pogut observar els pics corresponents al fòsfor, calci i oxigen (Figura 9-9, Figura 9-10 i Figura 9-11 respectivament).

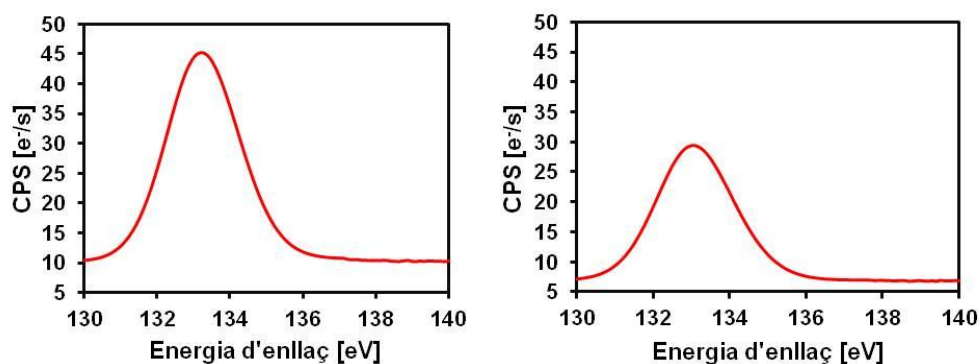


Figura 9-9. Espectres XPS en la banda del fòsfor (Esquerra HAp, dreta HAp-ADN)

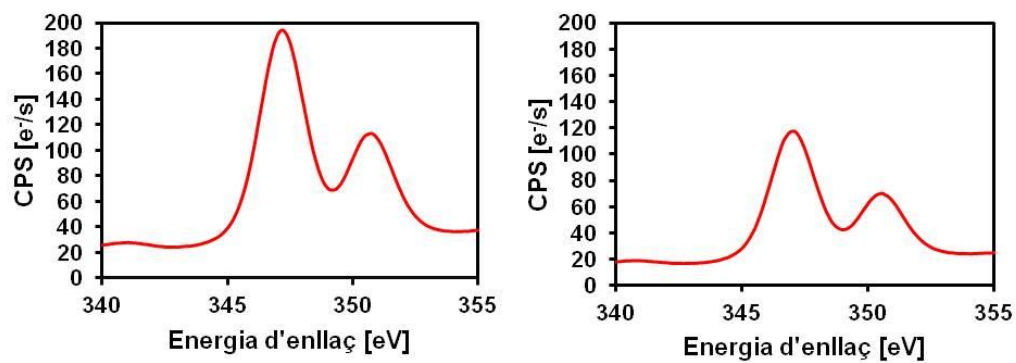


Figura 9-10. Espectres XPS en la banda del calci (esquerra HAp, dreta HAp-ADN)

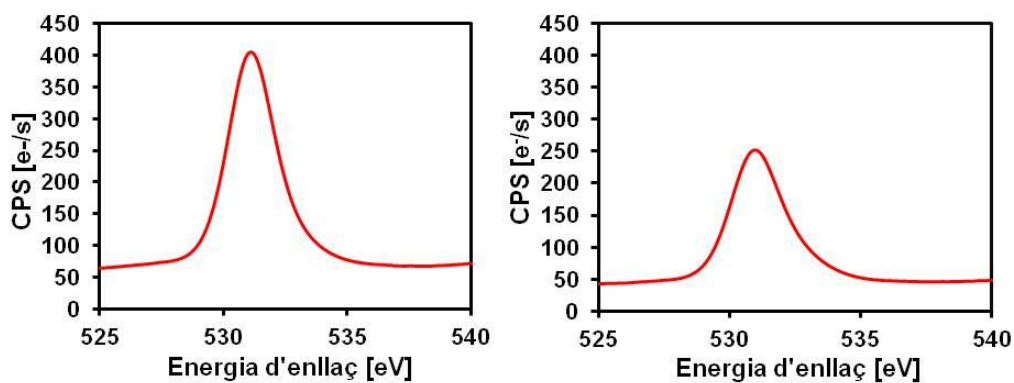
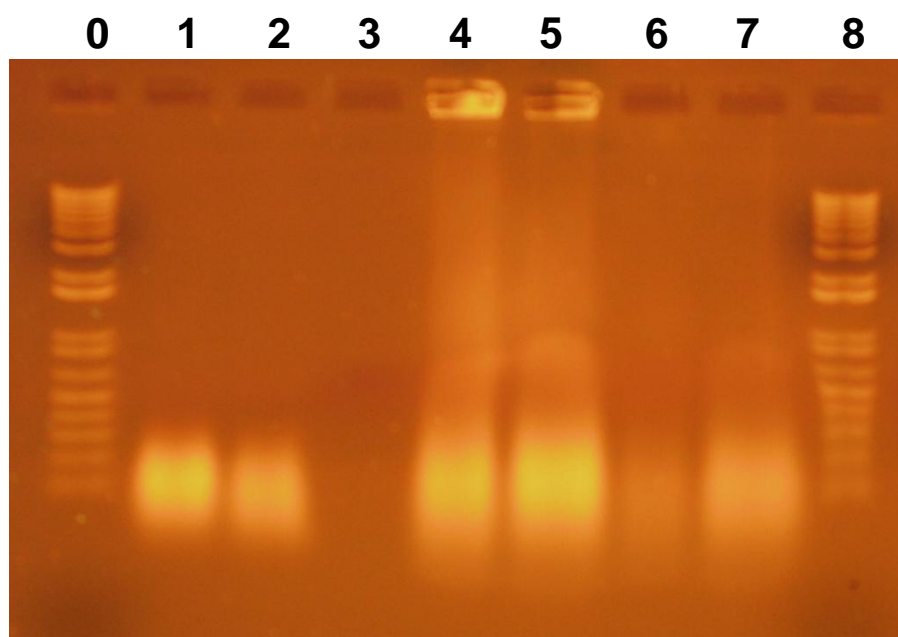


Figura 9-11. Espectres XPS en la banda de l'oxigen (esquerra HAp, dreta HAp-ADN)

### 9.2.4 Estudi de l'encapsulació amb electroforesi

En la Figura 9-12 es pot observar els resultats obtinguts en la electroforesi d'una de les mostres de partícules HAp-ADN sintetitzades en el laboratori mitjançant el mètode de precipitació a baixes temperatures (apartat 6.2.1).



**Figura 9-12 Gel electroforètic (nº1 marcador de pes molecular, nº 2 i 3 ADN d'esperma de salmó pur, nº4 HAp-ADN sencers, nº5 HAp-ADN destruïts amb EDTA, nº6 HAp-ADN netejats amb enzims, nº7 HAp-ADN netejats amb enzims i destruïts).**

En els carrils de les mostres no netejades amb enzims (nº 4 i 5) s'hi pot observar clarament el rastre de les cadenes de l'ADN (Figura 9-12), mentre que en el cas dels cristalls sotmesos al tractament amb nucleasa aquest rastre és molt més tènue (nº6), presumiblement degut a l'eliminació de l'ADN adsorbit a la superfície dels cristalls. La intensitat de la senyal augmenta de forma clara i pronunciada al destruir els cristalls (nº 7), fet que permet confirmar l'encapsulació de l'ADN.

No s'ha realitzat cap electroforesi dels cristalls preparats en l'autoclau (amb ADN) perquè l'anàlisi amb UV ha mostrat que no ha estat possible realitzar l'encapsulació amb aquest mètode.

### 9.3 Selecció del mètode per a l'encapsulació de plasmidi funcional.

Els estudis realitzats amb ADN d'esperma de salmó han servit per a determinar la tècnica i condicions òptimes per a preparar partícules de hidroxiapatita carregades amb ADN. S'ha observat que la preparació en reactor autoclau no és viable, i que la tècnica de precipitació a baixes temperatures sí que ho és.

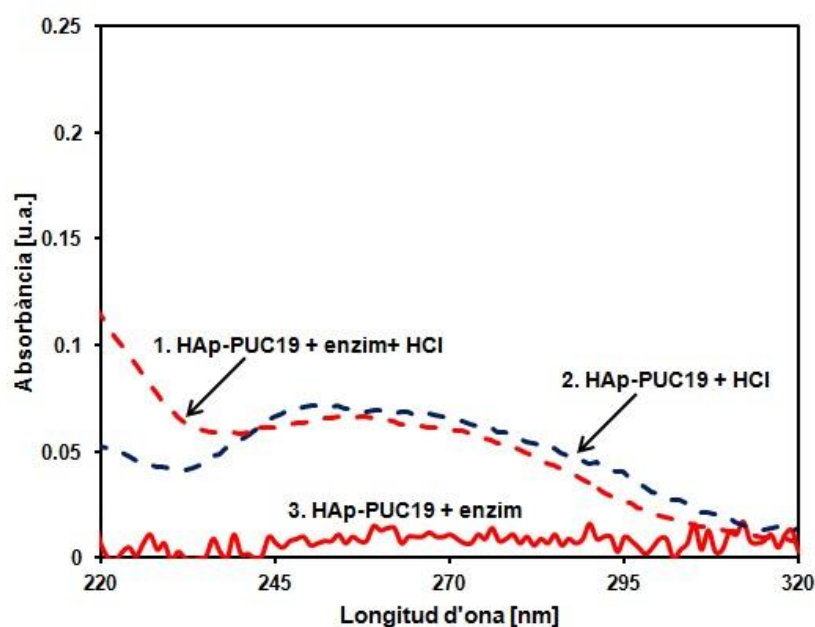
Partint d'aquesta base s'ha iniciat la última part d'aquest projecte: l'encapsulació de plasmidi funcional pUC19 i la transfecció a bacteries competents *Escherichia Coli* (soca DH 5α) per tal de comprovar si és possible que l'ADN encapsulat mantingui la seva funcionalitat. El plasmidi triat (pUC 19) conté un anell de resistència a l'ampicil·lina, que permetrà determinar si les bacteries han estat capaces de absorbir les nanopartícules, de dissoldre-les i de incorporar el plasmidi encapsulat.

A més, també s'ha desenvolupat un mètode eficient i ràpid per a confirmar l'encapsulació mitjançant les tècniques d'electroforesi i absorció al UV-visible i s'ha comprovat que la neteja amb enzims és eficient (i necessària) per a eliminar l'ADN adsorbit a la superfície.

## 10. Estudi de l'encapsulació de plasmidi funcional

### 10.1 Verificació de l'encapsulació mitjançant l'absorció en el UV-visible.

L'encapsulació d'un plasmidi pot ser més complicada que l'encapsulació de l'ADN d'esperma de salmó ja que presenta un pes molecular considerablement més elevat. En conseqüència, abans d'estudiar la funcionalitat del pUC19 és necessari comprovar que aquest està efectivament encapsulat a l'interior dels cristalls. En base a l'experiència adquirida en els experiments anteriors, la tècnica escollida per a realitzar aquesta comprovació és l'absorció al UV-visible.



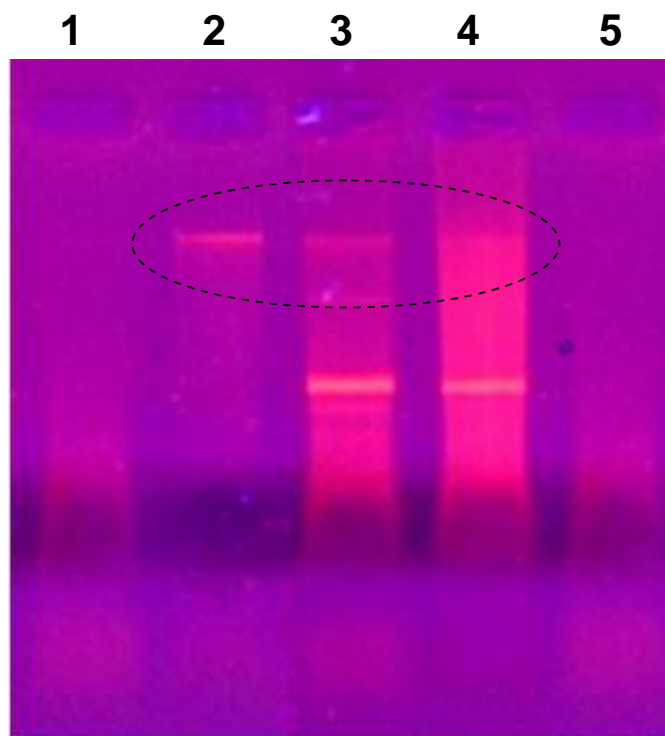
**Figura 10-1** Espectre UV-visible de cristalls HAp-pUC19. Corba 1 HAp-PUC19 rentades amb enzim i destruïdes amb àcid, corba 2 HAp-PUC19 no rentades amb enzim i destruïdes amb àcid, corba 3 HAp-PUC19 rentades amb enzim i no destruïdes.

Com es pot observar en la Figura 10-1. Apareix el pic característic als 260 nm tan en les mostres no netejades amb enzim com netejades. Així doncs, es pot afirmar que el plasmidi pUC19 ha sigut encapsulat.

## 10.2 Estudi de la funcionalitat del plasmidi encapsulat amb electroforesi

En aquest apartat es mostren els resultats obtinguts seguint el procediment de l'apartat 6.3.3. Les partícules HAp-PUC19 s'han emprat per a transformar bactèries competents que han adquirit l'anell de resistència a l'ampicil·lina. Una colònia d'aquestes bactèries s'ha amplificat en medi de cultiu amb ampicil·lina i posteriorment se'n ha extret el seu plasmidi, amb el qual s'ha realitzat aquesta electroforesi.

L'objectiu d'aquesta electroforesi (Figura 10-2) és assegurar que efectivament les colònies que han crescut a les plaques corresponen a les bactèries competents transfectades amb les partícules HAp-PUC19 i no a possibles contaminacions ambientals (fongs, espores, altres bactèries).



**Figura 10-2 Electroforesi del plasmidi pUC19 extret a les bactèries transfectades (carril nº2 pUC19 pur, carril nº3 bactèries transfectades amb HAp-pUC19 sotmeses al tractament enzimàtic, carril nº4 bactèries transfectades amb HAp-pUC19 no sotmeses al tractament enzimàtic).**

En el carril nº3 (Figura 10-2) s'hi poden observar varies línies horitzontals característiques del plasmidi que demostren que s'ha pogut realitzar la transfecció a bactèries competents *E. coli* emprant com a vector partícules d'hidroxiapatita amb plasmidi encapsulat (i havent-ne eliminat el superficial). També és important comentar el fet de que només una de les línies del segon carril apareix a la mateixa altura que la del carril nº 2 (corresponent a pUC19 pur control). Això podria ser degut a la ruptura de part del plasmidi en diversos fragments més petits durant el procés de purificació. Els fragments més petits recorrerien una distància més gran que el plasmidi que no s'ha trencat.

## **11. Avaluació de l'impacte ambiental i de salut (EIAS) i social.**

En aquest apartat es realitzarà una avaluació del perill que comporten algunes de les substàncies utilitzades en aquest PFC. S'emprarà la normativa vigent a la UE relativa al registre, avaluació, autorització i restricció de les substàncies i mescles químiques (REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals). El reglament REACH (CE) nº 1907/2006 va ser aprovat pel Parlament Europeu l'any 2006, i va suposar una reforma total del marc legislatiu sobre substàncies i mescles químiques en la Unió Europea.

L'any 2008 es va aprovar el reglament CE nº 1272/2008 (CLP: Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures), que tracta d'oferir uns criteris harmonitzats sobre els perills de les substàncies i mescles químiques. L'objectiu d'ambdós reglaments és garantir un alt nivell de protecció de la salut humana i del medi ambient, identificant les propietats fisicoquímiques, toxicològiques i ecotoxicològiques de substàncies i mescles. Amb aquesta finalitat es defineixen les frases H de perill, que substitueixen les antigues frases R i S.

S'ha de tenir en compte que algunes de les substàncies utilitzades no són perilloses segons el Reglament (CE) No. 1272/2008 ni estan classificades com a perilloses en la Directiva 67/548/CEE, i en conseqüència no tenen frases de perill associades:

- Citrat de sodi
- Clorur de sodi
- Fosfat amònic

- Agarosa
- RNasa A (de pàncrees boví)
- ADN d'esperma de salmó
- Enzim nucleasa  $\geq 2,000$  Kunitz/mg
- pUC19 (dissolució aquosa)
- LB agar

La Taula 11-1 recull les frases de perill de les substàncies emprades en aquest projecte i considerades com a perilloses en el marc de la legislació europea. En la Taula 11-3 es pot consultar el significat d'aquestes frases H.

**Taula 11-1. Frases de perill de les substàncies emprades**

Substància química	Frases de perill H		
	Salut	Ambiental	Físic
Nitrat de calci tetrahidratat			H272
Amoníac aquós (30%)	H314, H335	H400	
Àcid Nítric aquós (0,1 M)	H315, H319		H272
Àcid clorhídric aquós	H314, H315, H318, H335		
Surfactant CTBA	H302, H315, H318, H335	H400, H410	
Surfactant AOT	H302, H315, H318, H335		
Ciclohexà	H304, H315, H336	H400, H410	H225
Bromur d'etidi	H302, H330, H341		
EDTA	H319		
Trietanolamina	H319		
Monoetanolamina	H302, H332, H312, H314		
Ampicil·lina	H315, H317, H319, H334, H335		
Buffer TBE (conc. X10)	H315		
Hidròxid de calci	H315, H318, H335	H402	
Hidròxid de sodi	H314	H402	H290
Acetat de sodi	H314		
Acetat de potassi	H314		
Triton™ X-100	H302, H319	H411	
Dodecil sulfat de sodi	H302, H311, H315, H318, H335		H228
Etanol (96% v/v)			H225



A més de les frases de perill H, la normativa mencionada també recull l'existència de les frases P (de precaució). Aquestes frases indiquen una sèrie de mesures de protecció i precaució que es recomana aplicar per tal de garantir una manipulació segura de les substàncies i mescles químiques perilloses. La Taula 11-2 recull les frases P de les substàncies emprades en aquest treball.

Taula 11-2. Frases de precaució de les substàncies emprades

Substància química	Frases P
	Significat
Nitrat de calci tetrahidratat	P210, P220
Amoníac aquós (30%)	P261, P273, P280, P305, P310
Àcid Nítric aquós (0,1 M)	P305+P351+P338
Àcid clorhídric aquós	P261, P280, P305, P310
Surfactant CTBA	P261, P273, P280, P305+P351+P338, P501
Surfactant AOT	P280, P305+P351+P338
Ciclohexà	P210, P261, P273 P301+P310, P331, P501
Bromur d'etidi	P261, P281, P284, P310
EDTA	P305+P351+P338
Trietanolamina	P305+P351+P338
Monoetanolamina	P280, P305+P351+P338, P310
Ampicil·lina	P261, P280, 305+P351+P338, P342+P311
Buffer TBE (conc. X10)	P201, P308+P313
Hidròxid de calci	P261, P280, P305
Hidròxid de sodi	P280, P305, P310
Acetat de sodi	P310
Acetat de potassi	P310
Triton™ X-100	P273, P305+P31+P338
Dodecil sulfat de sodi	P210, P261, P280, P305+P351P338, P312
Etanol (96% v/v)	P210

En la Taula 11-3 es troben recollits els significats de les frases H de les substàncies emprades en aquest projecte.

**Taula 11-3. Significat de les frases H (Hazard statements)**

<b>Frases H</b>	<b>Explicació</b>
H225	Líquids inflamables (Categoria 2)
H272	Poden empitjorar un incendi: comburents
H290	Pot ser corrosiu per als metalls
H302	Toxicitat aguda, Oral (Categoria 4)
H304	Perill d'aspiració (Categoria 1)
H312	Toxicitat aguda, cutània (Categoria 4)
H314	Provoca cremades a la pell i lesions oculars greus (Categoria 1B)
H315	Irritació cutània (Categoria 2)
H317	Pot provocar reaccions al·lèrgiques en la pell
H318	Provoca lesions oculars greus
H319	Provoca irritació ocular greu (Categoria 2)
H330	Mortal en cas de inhalació
H332	Toxicitat aguda, Oral (Categoria 4)
H334	Pot provocar símptomes d'al·lèrgia o asma en cas d'inhalació
H335	Pot irritar les vies respiratòries
H336	Toxicitat específica en determinats òrgans - Exposició única (Categoria 3)
H341	Pot provocar defectes genètics
H400	Toxicitat aquàtica aguda (Categoria 1)
H410	Toxicitat aquàtica crònica (Categoria 1)
H411	Toxicitat aquàtica crònica (Categoria 2)

En la Taula 11-4 es troben recollits els significats de les frases de precaució de les substàncies emprades en aquest projecte.

**Taula 11-4. Significat de les frases P (precaution statements)**

<b>Frase P</b>	<b>Explicació</b>
P210	Mantenir allunyat de fonts de calor o guspires
P261	Evitar respirar pols/fum/gas/boira/aerosol
P220	Mantenir o emmagatzemar allunyat de roba/materials combustibles
P273	Evitar la seva alliberació al medi ambient
P280	Portar guants i ulleres de protecció
P281	Utilitzar EPI
P284	Utilitzar equip de protecció respiratòria
P301+P310	En cas d'ingestió trucar immediatament a un centre de toxicologia
P308+P313	En cas d'exposició consultar a un metge
P342+P311	En cas de símptomes respiratoris trucar a un centre de toxicologia
P305+P351+P338	En cas de contacte amb els ulls rentar amb aigua
P331	No provocar el vòmit
P501	Eliminar el contingut en una planta de tractament aprovada

La hidroxiapatita en sí no és considerada una substància perillosa en la normativa abans mencionada. A més, no es tòxica i presenta un elevat grau de biocompatibilitat, motius pels quals no presentaria un gran impacte ambiental durant el seu cicle de vida. Pel que fa a la gestió dels residus generats en el laboratori, aquests es separen en funció de si contenen elements halogenats o no, i de si presenten risc biològic (la hidroxiapatita es tractaria juntament amb els residus no halogenats i sense risc biològic). Aquests residus s'emmagatzemen en recipients de polietilè d'alta densitat (HDPE) i posteriorment són tractats per l'empresa gestora *ECOCAT* en col·laboració amb el *Centre per a la Sostenibilitat Territorial (CST)*.

Finalment, també és important mencionar l'inevitable impacte ambiental associat als subministres (electricitat, aigua etc...) i al degut a residus no relacionats directament amb les tasques de laboratori com ara cartró, envasos de plàstic entre d'altres. Aquest impacte no pot ser totalment eliminat però s'ha tractat de minimitzar mitjançant l'estalvi i el reciclatge.

Pel que fa a l'impacte social d'aquest projecte. Aquest podria ser el de servir de base per a futurs treballs en l'àmbit dels nanocomposites amb polímers biodegradables o altres substàncies per a la regeneració de teixits danyats. També podria contribuir a la recerca de vectors per a transportar medicaments i a entendre millor el paper de la hidroxiapatita com a vector no viral per a protegir i transportar material genètic.

## 12. Avaluació econòmica

L'avaluació econòmica del projecte es realitzarà tenint en compte 6 grups diferenciats de costos (equips, reactius, personal, serveis externs, subministres i overhead) que es detallaran a continuació:

- I) Costos dels equips: tenint en compte l'amortització, un interès del 3% , el nombre d'usuaris que els han emprat durant el temps que ha durat el projecte i la duració del mateix. L'equació emprada en el càlcul del cost ((Eq. 12-1-1) i els resultats obtinguts (Taula 12-1) es mostren a continuació:

$$\text{Cost per equip} = \text{Anualitat} \cdot \frac{\text{Duració del projecte}}{\text{n}^\circ \text{ usuaris}} ; \text{Anualitat} = P \cdot \frac{i \cdot (1+i)^n}{(1+i)^n - 1} \quad (\text{Eq. 12-1})$$

**Taula 12-1 Cost dels equips**

<b>Cost dels equips</b>				
<b>Concepte</b>	<b>Preu (€)</b>	<b>Amortització (anys)</b>	<b>nº usuaris</b>	<b>Total (€)</b>
Reactor autoclau	1800	10	2	61,55
TEM	190000	15	10	928,41
SEM	210000	15	10	1026,14
Espectrofotòmetre FTIR-ATR	24000	10	10	164,12
Espectrofotòmetre UV	22000	10	10	150,45
Centrífuga	30000	15	7	209,42
Equip electroforesis	500	5	5	12,74
Autoclau esterilització	2500	15	6	20,36
Equip desionització aigua miliQ	10000	10	10	68,38
Campana extracció de gasos	15000	10	5	205,15
Ph-metre	1000	5	5	25,47
Liofilitzador	18000	10	6	205,15
Agitador orbital	500	15	7	3,49
Placa calefactora	200	15	10	0,98
Càmera digital	600	5	5	15,28
<b>Subtotal equips</b>				<b>3097,1</b>

- II) Cost dels reactius (Taula 12-2): els preus s'han extret dels catàlegs de les empreses subministradores (Panreac, Sigma Aldrich i QIAGEN).

Taula 12-2 Cost de reactius i dissolvents

Cost reactius i dissolvents		
Concepte	Quantitat	Cost total (€)
Nitrat de calci tetrahidratat	500 g	55,7
Sal amònica de fosfat	500 g	34,3
Amoníac aquós (30%)	1 dm <sup>3</sup>	34,7
Àcid Nítric aquós (0,1 M)	1 dm <sup>3</sup>	31,3
Àcid clorhídric aquós	500 cm <sup>3</sup>	61,9
Clorur de sodi	500 g	35,5
Surfactant CTBA	100 g	37,8
Surfactant AOT	100 g	38,4
Ciclohexà	500 cm <sup>3</sup>	27,1
dihidrogen fosfat de potassi	100 g	41,8
ADN d'esperma de salmó	10 g	36,5
Enzim nucleasa ≥2,000 Kunitz/mg	2 g	62,8
Bromur d'etidi	1 g	68
EDTA	100 g	14
Trietanolamina	25 cm <sup>3</sup>	21,1
Monoetanolamina	25 cm <sup>3</sup>	23,6
Agarosa	10 g	38,8
Ampicil·lina	5 g	56,1
Buffer TBE (conc. X10)	1 dm <sup>3</sup>	52,3
Plasmidi pUC19	10 µg	86,7
Citrat de sodi	500 g	53,1
Hidròxid de calci	100 g	18,9
Hidròxid de sodi	500 g	20,4
TBX agar	100 g	95,2
EMB agar	500 g	105
LB agar	250 g	207
Kit purificació plasmidi (QIAprep®)	1 unitat	95,5
Etanol (96% v/v)	2,5 dm <sup>3</sup>	161,75
<b>Subtotal reactius i dissolvents</b>		<b>1519,75</b>

III) Per al cost de personal (Taula 12-3) es distingeixen tres conceptes diferents: les hores dedicades al estudi previ, les hores dedicades a la realització dels experiments i finalment les dedicades a l'anàlisi dels resultats. Per a aquest últim concepte s'ha fixat un preu per hora superior ja que s'entén que requereix més qualificació.

Taula 12-3. Cost de personal

Cost associat al personal			
Concepte	Quantitat (h)	Preu (€/h)	cost (€)
Recerca bibliogràfica i estudi previ	50	15	750
Experimentació en el laboratori	500	15	7500
Anàlisi de resultats	200	20	4000
<b>Subtotal personal</b>			<b>12250</b>

IV) Serveis externs (Taula 12-4): inclouen les lectures realitzades amb XPS i XDR.

Taula 12-4. Cost dels serveis externs

Cost dels serveis externs	
Concepte	cost (€)
XDR (1 lectura)	60
XPS (2 lectures)	120
<b>Subtotal serveis extens</b>	<b>180</b>

Sumant aquests quatre conceptes s'obté el cost d'activitat (Taula 12-5)

**Taula 12-5. Cost d'activitat**

<b>Cost d'activitat</b>	
<b>Concepte</b>	<b>cost (€)</b>
Reactius i dissolvents	1519,75
Personal	12250
Equips	3097,1
Serveis externs	180
<b>Total activitat</b>	<b>17046,85</b>

- V) S'afegeixen també el cost dels subministres, que es calcula aproximadament com un 10% del cost d'activitat i el cost d'overhead, que es calcula com un 21% de la suma del cost d'activitat i de subministres. Sumant tots aquests conceptes s'obté el cost total del PFC (Taula 12-6).

**Taula 12-6. Cost total PFC**

<b>Cost Total PFC</b>	
<b>Concepte</b>	<b>cost (€)</b>
Activitat	17046,85
Subministres (10% activitat)	1704,69
<b>Subtotal PFC</b>	<b>18751.54</b>
Overhead (21% del subtotal PFC)	3937,82
<b>Total PFC</b>	<b>22689,36</b>



## Conclusions

- 1) S'han determinat les condicions òptimes de pH i temperatura per a obtenir nanocristalls de morfologies diferenciades: nanolàmines, nanotubs, nanoesferes i nanoestelles. S'ha observat que tal i com està descrit en la literatura pH alts i temperatures baixes afavoreixen formes isotròpiques mentre que pHs baixos i temperatures elevades afavoreixen les formes anisotròpiques. Els cristalls sintetitzats presenten l'espectre IR i l'estructura cristal·lina característica de la hidroxiapatita.
- 2) No s'ha pogut clarificar les variables que afecten a la forma com els nanocristalls s'agrupen formant superestructures jerarquitzades d'agregats cristal·lins. Tampoc s'ha arribat a estudiar en profunditat l'efecte d'additius com surfactants (CTBA), agents complexants del calci i agents dispersants (etanolamines) sobre la morfologia i agregació finals.
- 3) Segons les observacions realitzades, la presència d'ADN en el medi de reacció no sembla alterar la morfologia dels cristalls sintetitzats. Els cristalls que tenen ADN encapsulat no poden ser diferenciats dels que no en tenen mitjançant microscòpia electrònica (SEM-TEM).
- 4) S'ha encapsulat amb èxit ADN d'esperma de salmó. L'encapsulació s'ha confirmat a través de les tècniques de UV, XPS i electroforesi. La preparació a baixes temperatures ha resultat ser adequada per a encapsular ADN. En canvi, l'encapsulació no s'ha pogut realitzar a altes temperatures mitjançant reactor autoclau, probablement perquè les agressives condicions del medi de reacció acaben degradant l'ADN.
- 5) S'ha emprat un mètode eficient per a eliminar l'ADN adsorbit a la superfície mitjanant un tractament amb enzims de *desoxyribonucleasa*. S'ha constatat que netejar els cristalls amb aigua miliQ, dissolucions aigua-etanol i dissolucions tampó a base de fosfats no és suficient per a eliminar tot l'ADN superficial.

- 6) L'ADN encapsulat a l'interior dels cristalls preparats en les diferents experiències sembla ser poc detectable mitjançant les tècniques de UV i de IR. La forma més eficient de detectar l'ADN encapsulat consisteix en alliberar-lo destruint els cristalls per acidificació del medi. La tècnica de UV és la més adequada per a dur a terme aquesta metodologia de detecció.
- 7) S'ha encapsulat amb èxit el plasmidi pUC19 amb un anell de resistència a l'ampicil·lina. L'encapsulació en els nanocristalls ha sigut confirmada mitjançant UV.
- 8) S'ha pogut transfectar el plasmidi a bactèries competents *Escherichia Coli* (soca DH 5 $\alpha$ ) utilitzant nanopartícules d'HAp com a vector. Fet que confirma que l'ADN ha mantingut seva funcionalitat un cop encapsulat i demostra la seva potencialitat com a vector no viral.

## Agraïments

En primer lloc m'agradaria agrair a l'empresa B.Braun el finançament i la oportunitat de prendre part aquest projecte. Agrair de manera especial a en Pau Turon, director d'assumptes regulatoris de R&D i qualitat, sense la visió del qual aquest projecte no s'hauria realitzat, per les idees que ha aportat durant tots aquests mesos i per l'entusiasme que ha sabut transmetre.

Agrair tot el seu esforç, la paciència i dedicació als meus tutors Dr. Jordi Puiggalí i el Dr. Luis Javier del Valle, a més de tots els coneixements que m'han transmès durant el temps que he format part del grup PSEP. També m'agradaria agrair a la Dra. Maria Teresa Casas la seva ajuda, consells i tota la paciència en les observacions en el microscopi electrònic.

M'agradaria també mostrar el meu agraïment a totes les persones que treballen en el grup: els professors, doctorands, investigadors i estudiants que realitzen el seu PFC ja que sempre m'han ofert la seva ajuda quan ho he necessitat i han fet que marxi amb un gran record de la estància en aquest grup.

Finalment, agrair a la meva família la seva paciència durant aquests mesos i especialment tot el suport que m'han donat durant tots aquests anys d'estudis que conclouen amb aquest projecte. I per últim a la meva parella Eri, simplement gràcies per compartir els moments bons i dolents durant tot aquest temps.

# Bibliografia

## Referències bibliogràfiques

Les referències bibliogràfiques classificades segons l'ordre d'aparició en el text es mostren a continuació:

- [1] Atsuo, I., Kazuo, O. *Growth of Hydroxyapatite Crystals*. Crystal Growth Technology, vol 16, 2003, p. 525-559.
- [2] Nurse, RW., Welch, JH., Gutt, W. *A new form of tricalcium phosphate*. Nature. Vol. 182, 1958, p.1230.
- [3] Uskokovic, V.,Uskokovic, D., P., *Review Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents*. Journal of biomedical materials research B: applied biomaterials Vol. 96B (1), 2011.
- [4] Revilla-López [et al.]. *Modeling biominerals formed by apatites and DNA*. Biointerphases, 8:10, 2013.
- [5] Tonegawa, T., Ikoma, T., Yoshioka, T., Hanagata, N., Tanaka, J. *Crystal structure refinement of A-type carbonate apatite by X-ray powder diffraction*. J Mater Sci. Vol. 45, 2010, p. 2419 - 2426.
- [6] Fleet, ME., Lui, X., King, P. *Accommodation of the carbonate ion in apatite: An FTIR and X-Ray structure study of crystals synthesized at 2-4 GPa*. Am Mineral, Vol. 89, 2004, p. 1422–1434.
- [7] Peroos, S. [et al.]. *A computer modelling study of the uptake, structure and distribution of carbonate defects in hydroxy-apatite*. Biomaterial. Vol. 27, 2006, p. 2150–2161.
- [8] Hankermeyer, C. R. et al. *Dissolution rates of carbonated hydroxyapatite in hydrochloric acid*. Biomaterials. Vol. 23, 2002, p. 743–750.

- [9] Mkhontoa, D., Leeuw N., H., *A computer modelling study of the effect of water on the surface structure and morphology of fluorapatite: introducing a  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$  potential model*. J. Mater. Chem. Vol. 12, 2002, p. 2633–2642.
- [10] Kirkham, J., [et al.]. *Physico-chemical properties of crystal surfaces in matrix-mineral interactions during mammalian biomineralisation*. Curr Opin Colloid Interface Sci. Vol. 7, 2002, p. 124–132.
- [11] Posner, A. S. Stutman, J.M., Lippincott, E.R., *Hydrogen-bonding in calcium-deficient*. Nature. Vol 188, 1960, p. 486-487.
- [12] Schroder, E., Jonsson T., Poole L. *Hydroxyapatite chromatography: Altering the phosphate-dependent elution profile of proteins as a function of pH*. Analytical Biochem. Vol. 313, 2003, p.176–178.
- [13] Kostetsky, E.Y. *The possibility of the formation of protocells and their structural elements in apatite crystals*. J. Evol Biochim Physiol. Vol 31, 1999, p. 607–638.
- [14] Simionescu, Cl., [et. al.]. *Synthesis of saccharides by cold plasma decomposition in methane-water-apatite system*. Cellulose Chem Technol. vol 12, 1978, p143–152.
- [15] Zhu, S. H., [et. al.]. *Hydroxyapatite nanoparticles as novel gene Carrier*. Journal of nanoparticle Research. vol 6, 2004, p. 307-311.
- [16] Motskin, M. [et al.]. *The sequestration of hydroxyapatite nanoparticles by human monocyte-macrophages in a compartment that allows free diffusion with the extracellular environment*. Biomaterials. vol. 32, 2011, p. 9470-9482.
- [17] Giovannini, R., Freitag, R. *Comparison of different types of ceramic hydroxyapatite for the chromatographic separation of plasmid DNA and a recombinant anti-rhesus D antibody*. Bioseparation; vol 9, 2000, p. 359–368.

- [18] Bankston, T., [et al.]. *pH transients in hydroxyapatite chromatography columns- Experimental evidence and phenomenological modelling*. Journal of Chromatography. vol. 1216, 2010, p.2123-2131
- [19] Fujii S, Okada M, Furuzono T. *Hydroxyapatite nanoparticles as stimulus-responsive particulate emulsifiers and building block for porous materials*. J Colloid Interface Sci. Vol. 315, 2007, p. 287–296.
- [20] Reichert, J., Binner, JGP. *An evaluation of hydroxyapatite-based filters for removal of heavy metal ions from aqueous solutions*. J Mater Sci. Vol. 31, 2004, p. 1231–1241.
- [21] Venugopal, J., [et al.]. *Biomimetic hydroxyapatite-containing composite nanofibrous substrates for bone tissue engineering*. Phil. Trans. R. Soc. A , Vol. 386, 2010, p. 250-260.
- [22] Weiner, S., Traub, W. *Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils*. FEBS Lett. Vol. 206, 1986, p. 262–266.
- [23] Weiner, S., Traub, W. *Crystal size and organization in bone*. Connect Tissue Research. Vol. 21, 1989, p. 589-595.
- [24] Porter, A., [et al.]. *Effect of carbonate substitution on the ultrastructural characteristics of hydroxyapatite implants*. J. Mater. Sci. Mater. Med. Vol. 16, , 2005, p. 899–907.
- [25] Chen, F., Wang, Z. C. & Lin, C. J. *Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nanocomposite for use in biomedical materials*. Mater. Lett. Vol. 57, 2002, p. 658–662.
- [26] Li, C., [et al.]. *Silk apatite composites from electrospun fibers*. J. Mater. Res. Vol. 20, 2005, p. 3374–3384.
- [27] Wopenka, B., Pasteris, J. *A mineralogical perspective on the apatite in bone*. Mater Sci Eng C. Vol. 25, 2005, p. 131–143.

- [28] Motskin, M., [et al.]. *The sequestration of hydroxyapatite nanoparticles by human monocyte-macrophages in a compartment that allows free diffusion with the extracellular environment*. Biomaterials. Vol. 32, 2011, p. 9470-9482.
- [29] Bisht, S., *DNA loaded calcium phosphate nanoparticles Highly efficient non-viral vector for gene delivery*. Int J Pharm. Vol. 288, 2005, p. 157–168.
- [30] Maffei, T. G. G., Wright, C.J., Doak, S.H. *NanoGenotoxicology The DNA damaging potential of engineered nanomaterials*. Biomaterials. Vol. 30, 2009, p. 3891–3914.
- [31] Dorozhkin, S.V., Epple, M. *Biological and medical significance of calcium phosphates*. Angew Chem Int Ed. Vol. 41, 2002, p.3130–3146.
- [32] Olton, D., [et al.]. *Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: Influence of the synthesis parameters on transfection efficiency*. Biomaterials. Vol. 28, 2007, p. 1267–1279.
- [33] Fischer, E.K. *Biomimetic nanowire coatings for next generation adhesive drug delivery systems*. Nano Lett. Vol. 9, 2009, p. 716–720.
- [34] Olton, D, [et. al.]. *Intracellular trafficking pathways involved in the gene transfer of nano-structured calcium phosphate-DNA particles* Biomaterials. Vol. 32, p. , 2011, p. 7662-7670.
- [35] Epple, M., *Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine*. J Mater Chem. Vol. 20, 2010, p.18–23.
- [36] Zhang, C., [et al.]. *Hydroxyapatite Nano- and Microcrystals with Multiform Morphologies: Controllable Synthesis and Luminescence Properties*. Crystal Growth & Design. Vol. 9, 2009, No. 6.
- [37] Wang, P., [et al.]. *Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process*. Powder Technology. Vol. 203, 2010, p. 315–321.

- [38] Sato, K., [et al.]. Agglomeration control of hydroxyapatite nanocrystals grown in phase-separated microenvironments *J Mater Sci.* Vol. 41, 2006, p. 5424–5428.
- [39] Rouhani, P., Taghavinia, N., Rouhani, S. *Rapid growth of hydroxyapatite nanoparticles using ultrasonic irradiation.* *Ultrasonics Sonochemistry.* Vol. 17, , 2010, p. 853–856.
- [40] Ren, F., [et al.]. *Growth of one-dimensional single-crystalline hydroxyapatite nanorods* *Journal of Crystal Growth.* Vol. 349 2012, p. 75–82.
- [41] Rhee, S. H. *Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment.* *Biomaterials.* Vol. 23, 2002, p. 1147–1152.
- [42] Briak-BenAbdeslam, H. E., [et al.]. *Wet or dry mechanochemical synthesis of calcium phosphates? Influence of the water content on DCPD–CaO reaction kinetics.* *Acta Biomaterialia.* Vol. 4, 2008, p. 378–386.
- [43] Ramesh, S. [et al.]. *Sintering properties of hydroxyapatite powders prepared using different methods.* *Ceramics International.* Vol. 39, 2013, p. 111–119.
- [44] Wang, Y., [et al.]. *Surfactant-assisted synthesis of hydroxyapatite particles.* *Materials Letters.* Vol. 60, 2006, p. 3227–3231
- [45] Paz, .A, [et al.]. *A comparative study of hydroxyapatite nanoparticles synthesised by different routes.* *Quim. Nova.* Vol. 35(9), 2012, p. 1724-1727.
- [46] Neira, I. [et al.]. *Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite whiskers with sharp faceted hexagonal morphology.* *J Mater Sci.* Vol. 43, 2008, p. 2171–2178.
- [47] Saha, S., [et al.]. *Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite using surfactant template systems: Role of templates in controlling morphology.* *Materials Science and Engineering.* N° C 29, 2009, p. 2294–2301.



- [48] Zhang, Y., Lu, J., A simple method to tailor spherical nanocrystal hydroxyapatite at low temperature. *Journal of Nanoparticle Research*. Vol. 9, 2007, p. 589-594.
- [49] Tari, N. E., Motlagh M., Shorabi, B., *Synthesis of hydroxyapatite particles in cationic mixed surfactants template*. *Materials Chemistry and Physics*. Vol. 131, 2011, p. 132–135.
- [50] Shih, W. J., Wang, M., Hon, M. *Morphology and crystallinity of the nanosized hydroxyapatite synthesized by hydrolysis using cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) as a surfactant*. *Journal of Crystal Growth*. Vol. 275, 2005, p. 2339–2344.
- [51] Ma, M. *Hierarchically nanostructured hydroxyapatite: hydrothermal synthesis, morphology control, growth mechanism, and biological activity*. *International Journal of Nanomedicine*. Vol. 7, 2012, p. 1781–1791.
- [52] Kobayashi, T., [et al.]. *Morphological variation of hydroxyapatite grown in aqueous solution based on simulated body fluid*. *CrystEngComm*. Vol. 14, 2012, p. 1143.

## Bibliografia complementaria

- [1] Choi, D., Kumtaw, P., *An alternative chemical route for the synthesis and thermal stability of chemically enriched hydroxyapatite*. *J. Am. Ceram. Soc.* Vol. 89 (2), 2006, p. 444–449.
- [2] Bose, S., Saha, S. *Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanopowders by emulsion technique*. *Chem. Mater.* Vol. 15, 2003, p. 4464-4469.
- [3] Zuo, G., [et al.]. *Synthesis and characterization of a lamellar hydroxyapatite/DNA nanohybrid*. *Materials Chemistry and Physics*. Vol. 126, 2011, p. 470–475.
- [4] Marthin, T. G., Dietz, H. *Magnesium-free self-assembly of multi-layer DNA objects*. Vol. 3, 2012, p. 1103.

- [5] Singh, R., Saxena, A., Mozumdar, S. Calcium Phosphate—DNA Nanocomposites: *Morphological Studies and Their Bile Duct Infusion for Liver-Directed Gene Therapy*. Int. J. Appl. Ceram. Technol. Vol. 5(1), 2008, p. 1–10.
- [6] Christoffersen, M. R., Dohrup, J., Christoffersen j. *Kinetics of growth and dissolution of calcium hydroxyapatite in suspensions with variable calcium to phosphate ratio*. Journal of Crystal Growth. vol. 186, 1998, p. 283-290.
- [7] Shellis, R. P., [et al.]. *Effects of pH and acid concentration on erosive dissolution of enamel, dentine and compressed hydroxyapatite*. Eur J Oral Sci. Vol. 118, 2010, p. 475–482.
- [8] Christoffersen, M. R., Dohrup, J., Christoffersen j. *The importance of formation of hydroxyl ions by dissociation of trapped water molecules for growth of calcium hydroxyapatite crystals*. Journal of Crystal Growth. Vol. 186, 1998, p. 275-282.
- [9] Delgado-López, J. M., *Two crystallization routes to synthesize carbonate apatite nanoparticles for biomedical applications*. LEC, IACT (CSIC-UGR). Ed. Inst. López Neyra. PT Campus de la Salud.
- [10] Ferraz, M. P., [et al.]. *A 3D type I Collagen/ Hydroxtapatite nanoparticles composite for bone regeneration*. NanoSpain2008. 14-17 April 2008 Braga – Portugal.
- [11] Campos, L., Casas, M. T., Franco, L. Rodríguez-Galán, A., Saperes, N., Urpí, L. Experimentació en Enginyeria Química IV. Prácticas de laboratorio. ETSEIB-CPDA 2012.